

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR *FUSIFORMIS NUCLEATUS* (KNORR) ET SON POUVOIR PATHOGÈNE POUR L'HOMME ET LES ANIMAUX

par A. R. PRÉVOT, P. TARDIEUX, L. JOUBERT et F. DE CADORE (*)

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies,
et Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon)

En 1923 [1], Knorr a décrit, sous le nom de *Fusobacterium nucleatum*, un fusiforme immobile, sérophile, présentant des granules chromaffines visibles après les colorations usuelles non spécifiques de l'appareil nucléaire, mais qu'il interpréta comme des noyaux véritables. Cette description, adoptée par certains auteurs, critiquée par d'autres, a été admise sous toutes réserves par l'un de nous en 1940 [2]. En effet, à cette époque, il n'existait encore aucune preuve absolue de l'autonomie de cette espèce : le caractère d'équivalents du noyau sur lame colorée par les méthodes non spécifiques est en fait commun à tous les fusiformes et par ailleurs les caractères enzymatiques décrits n'étaient pas suffisants pour individualiser une espèce nouvelle. Mais à partir de 1947, il nous a été donné d'étudier 14 souches répondant à la description de *F. nucleatus* et de mettre en évidence son individualité et son pouvoir pathogène. Ces faits, joints à ceux qui ont été publiés par divers auteurs, permettent de faire le

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

point sur cette espèce intéressante, beaucoup plus fréquente que l'on pouvait supposer d'après la littérature la concernant.

HISTORIQUE. — Nous n'insisterons pas sur le problème de nomenclature posé dès 1922 au sujet du genre comprenant l'espèce *F. nucleatus*, problème aujourd'hui encore non résolu :

A cette époque, ce genre avait déjà deux noms synonymes : *Fusiformis* Hoelling 1910 ; *Fusobacterium* Lehmann et Neumann 1926.

A partir de 1930 et jusqu'en 1940, les éditions successives du *Bergey's Manual* avaient utilisé le nom générique *Fusiformis* à cause de sa priorité. Topley et Wilson, de même que Prévot, ont adopté et conservé cette manière de voir. Mais sous l'influence des idées de Stanier [3] qui considère que les microorganismes ayant servi à Hoelling en 1910 pour la description du genre *Fusiformis* sont plutôt des Myxobactériales voisines des *Cytophaga*, les successeurs de Bergey sont revenus au terme générique *Fusobacterium* L. et N. et emploient le binome *Fusobacterium nucleatum* Knorr, suivis en cela par de nombreux auteurs. Nous pensons que la divergence de vue provisoire entre la nomenclature germano-américaine d'une part et anglo-française d'autre part ne pourra être résolue que par de nouveaux travaux d'ordre morphologique et taxonomique sur les fusiformes de la termite.

Beaucoup plus important est le problème de l'autonomie de l'espèce, impossible à prouver avec les premières descriptions. Nous avons dit que *F. nucleatus* n'est pas le seul Fusiforme à montrer son appareil nucléaire sans coloration spéciale : *F. fusiformis*, *F. polymorphus*, *F. biacutus* peuvent, dans certaines phases de leur croissance, le montrer aussi. D'autres *Spherophoraceae*, autres que les Fusiformes, peuvent également le montrer : telles certaines espèces de *Spherophorus* et de *Leptotrichia*. C'est cependant en se fondant sur ce seul caractère cytologique que beaucoup d'auteurs ont posé l'étiquette de *F. nucleatus*.

Il en est résulté des confusions, telles que celles de Grumbach et Verdan (1935) [4] rectifiées plus tard par ces auteurs eux-mêmes grâce aux travaux de Lemierre et Reilly [5] qui avaient reconnu qu'il s'agissait en réalité de souches de *Sph. funduliformis*. Ces erreurs de détermination ont jeté le doute sur l'existence même de l'espèce et il a fallu les travaux de Sussmann et Dicker en 1938 [6 et 7] pour la réhabiliter : chez un homme présentant un empyème pleural, ces auteurs ont isolé une culture pure de *F. nucleatus* dont l'étude très complète a été faite par Dicker : elle présente bien les granules surcolorés décrits par Knorr, dont la substance ne présente pas les caractères cytochimiques de la vultine, mais sur la nature de laquelle l'auteur ne s'est pas prononcé. Ses caractères culturels ont été précisés : exigence permanente d'un facteur de croissance contenu dans l'ascite non chauffée, absence de pouvoir gazogène, odeur fétide modérée, fermentation du glucose, lactose, saccharose, galactose, inuline, dulcitol, sorbitol,

adonitol et inositol. L'inoculation du pus total ou de la culture pure au cobaye ou au lapin provoque un abcès local à pus grumeleux, ne contenant que le germe introduit. La réaction de fixation dans le sérum du malade ou du lapin inoculé est positive.

Cet important travail a permis à notre collaborateur Robin, en 1948 [8], d'identifier la souche 313 E isolée dans le pus d'une actinobactériose faciale où elle était associée à *A. abscessum* et d'en compléter la description : pouvoir réducteur marqué, exigence permanente d'un facteur de croissance du sérum frais, existence de deux formes de colonies en gélose profonde : colonies lenticulaires et colonies irrégulières, opaques, constellées de microcolonies ouatées translucides ; non-liquéfaction de la gélatine, non-attaque du lait ni des protéines. pouvoir glucidolytique étendu ; réduction des nitrates en nitrites et type fermentaire tout différent de celui de *F. fusiformis* : propionique-valérianique-lactique, avec production d' NH_3 , SH_2 , amines volatiles, cétones et acétoïne.

Ce travail fondamental nous permet de douter que Jackins et Barker, en 1951 [9], ont travaillé avec une souche authentique de *F. nucleatus*, puisque l'attaque des amino-acides et des hydrates de carbone obtenue avec leur souche est du type butyrique, ce qui serait plutôt le fait soit de *F. fusiformis*, dont certaines souches montrent leur appareil nucléaire aussi bien que *F. nucleatus*, soit d'une variété propionique-butyrique de *F. nucleatus* que nous avons plusieurs fois rencontrée. Il sera facile de lever ce doute puisque sa souche attaque la sérine, la thréonine, la cystine, la cystéine, la lysine, l'histidine, la tyrosine et l'acide glutamique, n'attaque pas les acides mono-aminés et mono-carboxyliques et qu'ainsi la comparaison avec des souches authentiques (propionique-valérianique) de *F. nucleatus* pourra être faite.

En 1953, Omata [10] a reconnu que le facteur de croissance exigé par *F. nucleatus* se trouve aussi dans l'extrait de levure : c'est une substance dialysable, détruite par hydrolyse acide ou alcaline, inaltérable par digestion enzymatique, soluble dans l'éthanol à 95°, non-extractible par l'éther éthylique, le benzène, le chloroforme, et partiellement seulement par l'acétone. Ce principe actif n'est pas remplaçable par les nombreux facteurs de croissance connus, y compris le complexe des vitamines B, les acides nucléiques, le facteur *citrovorum*, l'adénosine, l'acide adénylique, l'acide guanylique et la thiamine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Depuis 1947, 14 souches de *F. nucleatus* ont été isolées dans le Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur et étudiées aussi complètement que possible.

Voici l'origine de nos souches :

313 E. Isolée d'une cellulite génio-massétérierne après accident de la dent de sagesse (D^r Béal, hôp. Tenon) associée à *Actinobacterium abscessum* et à un diplocoque aérobie ; étudiée par Robin [8]. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique.

390. Isolée d'une pleurésie purulente putride après infection

focale bucco-pharyngée (D^r Jacob, hôp. Saint-Antoine) associée à *Staphylococcus anaerobius*. Étudiée par A.-R. Prévot. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique.

402 D. Isolée d'un abcès du maxillaire après fracture ouverte. Origine buccale (D^r Béal, hôp. Tenon) associée à *Corynebacterium granulosum*. Étudiée par Linhard. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique.

679 H. Isolée d'une cellulite cervico-faciale dont l'infection focale initiale était une amygdalite chronique (D^r Rudich, hôp. Tenon) associée à *V. parvula* et *M. grigoroffi*. Étudiée par P. Tardieux. Type fermentaire : propionique-butyrique-lactique.

854 x. Isolée d'une actinomycose cervicale vraie d'origine bucco-dentaire (D^r Beraud, hôp. Pasteur) associée à *Actinomyces bovis* et *Cl. sporogenes*. Étudiée par R. Poumet. Type fermentaire : propionique-butyrique-lactique.

952 B. Isolée dans un cas d'actinobactériose rétro-maxillaire d'origine bucco-dentaire (D^r Lacaisse, hôp. Cochin) associée à *Actinobacterium israeli*. Étudiée par P. Tardieux. Type fermentaire : propionique-butyrique-lactique.

960. Isolée d'un abcès para-parotidien d'origine bucco-dentaire en culture pure (D^r Béal, hôp. Tenon). Étudiée par P. Tardieux. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique.

1201 B. Isolée d'une pseudo-actinomycose pulmonaire d'origine buccale en culture pure (D^r Even, hôp. Laënnec). Étudiée par P. Tardieux. Type fermentaire : propionique-butyrique-lactique.

1210. Isolée d'une collection purulente massétérine au cours d'un phlegmon dentaire (dent de sagesse) en culture pure (D^r Béal, hôp. Tenon). Étudiée par C. Mazurek. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique.

1262 A. Isolée d'une ascite purulente d'origine appendiculaire (D^r Huet, Tunis) associée à *Spherophorus gulosus*. Étudiée par P. Tardieux. Type fermentaire : propionique-valérianique.

1258 B. Isolée de crachats purulents de tuberculeux (hôpital de Créteil) ; origine bucco-pharyngée associée à *V. parvula* et à *Corynebacterium anaerobium*. Étudiée par F. de Cadore. Variété *ochraceus*. Type fermentaire : propionique-formique-lactique.

1371 B. Isolée d'un abcès putride du poumon d'origine bucco-pharyngée (D^r Delavelle, hôp. de Chauny) associée à *Actinob. meyeri* et à *Streptococcus intermedius*. Étudiée par H. Thouvenot. Type fermentaire : propionique-valérianique.

1411. Isolée d'un abcès sous-cutané du chat, par morsure d'un congénère (professeur Joubert, Ecole Vétérinaire de Lyon) ; culture pure. Étudiée par F. de Cadore. Variété *ochraceus*. Type fermentaire propionique-formique-lactique.

1474. Isolée d'un abcès du foie d'origine cæcale probable découvert à l'autopsie en culture pure (Dr Caroli, hôp. Saint-Antoine). Étudiée par F. de Cadore. Type fermentaire : propionique-valérianique-lactique (1).

Les recherches pratiquées sur ces 14 souches ont permis d'étendre nos connaissances sur l'habitat, la cytologie, les caractères culturels et biochimiques, le pouvoir pathogène de *F. nucleatus* et son comportement vis-à-vis des antibiotiques.

I. HABITAT. — L'habitat de 12 de nos souches était la cavité bucco-pharyngée alors que pour les deux autres c'était l'intestin (appendice pour l'une, cæcum pour l'autre). Dans l'ensemble, l'habitat de *F. nucleatus* est donc l'appareil digestif. Sur les 12 souches d'origine bucco-pharyngée, 3 provenaient d'infections dentaires, 1 d'infection amygdalienne, les autres d'un état infectieux général de la cavité bucco-pharyngée.

II. CYTOLOGIE. — Knorr avait admis sans preuve que les granules surcolorés par les méthodes non spécifiques étaient des noyaux. Dicker avait prouvé qu'il ne s'agissait pas de granules de volutine, mais n'avait pas prouvé qu'il s'agissait de substance nucléaire.

Nous avons appliqué à des corps microbiens jeunes, lavés et fixés, la méthode de coloration de la substance nucléaire que nous avons employée antérieurement pour étudier le cycle nucléaire des *Spherophorus*, des *Actinobacterium* et des *Bifidobacterium* [41, 42]. Nous avons pu ainsi constater que le granule central unique des formes courtes, que les 2 granules des formes moyennes, que les 4, 6, 8, 16 granules, etc., des formes longues, filamenteuses, étaient bien de l'acide désoxyribonucléique et que la multiplication des granules nucléaires au fur et à mesure que la bactérie s'allongeait, était le résultat de la division nucléaire, parallèle à la division cellulaire. On peut suivre ce cycle sur la photomicrographie (fig. 1). On y verra de plus que, parfois, il se forme des sphéroïdes de petite taille, riches en substance nucléaire et beaucoup moins nombreux que dans le genre *Spherophorus*. Le fait que ces équivalents du noyau se laissent facilement mettre en évidence par les colorations non spécifiques et en particulier par la fuchsine diluée, montre qu'il s'agit d'un acide désoxyribonucléique de structure différente de celui des Eubactériales. Malgré sa taille relativement petite, *F. nucleatus*

(1) L'observation clinique et anatomo-pathologique de ce très intéressant cas sera publiée intégralement par J. Caroli et ses collaborateurs dans la *Revue médico-chirurgicale des Maladies du Foie, de la Rate et du Pancréas*.

constitue donc un matériel de choix pour l'étude de l'appareil nucléaire des Actinomycétales, en particulier du déterminisme de son apparition en fonction de la constitution du milieu et de la

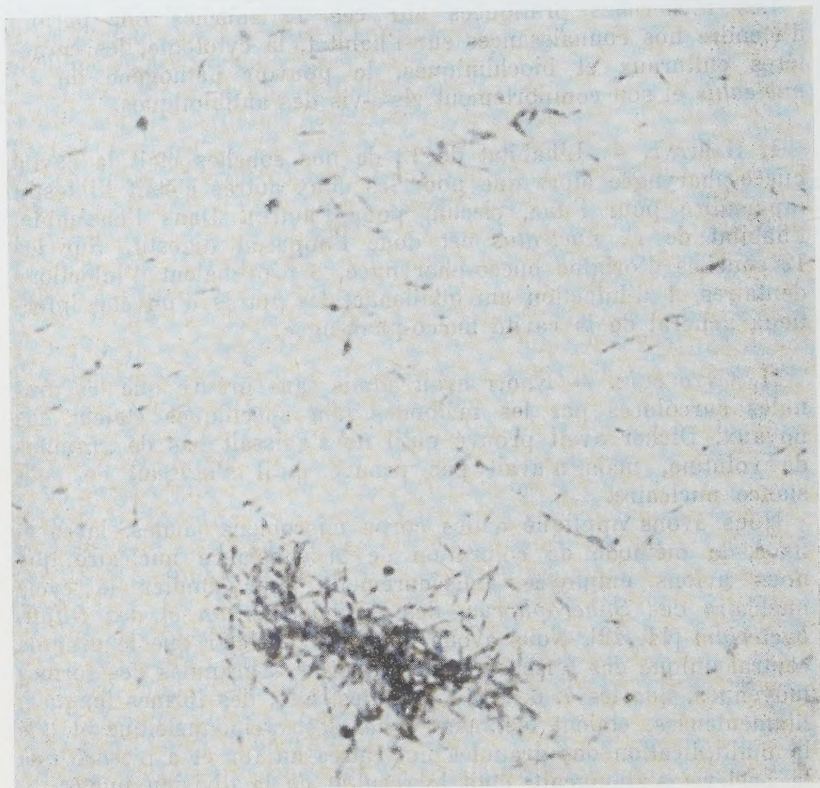


FIG. 1. — *F. nucleatus* souche 960. Gross. $\times 930$. Agrand. $\times 1\,395$.

croissance et surtout pour connaître le cycle nucléaire de cette espèce.

III. CARACTÈRES CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES. — L'ensemble des caractères cultureux décrits d'abord par Knorr, puis par Robin et d'autres auteurs a été retrouvé dans nos souches. C'est donc une espèce réductrice, non gazogène, fétide, sérophile obligée et permanente, glucidolytique, indologène, désulfhydri-lante, désaminante ; toutefois, on note des différences marquées d'une souche à l'autre dans le pouvoir glucidolytique, depuis les

souches n'attaquant que quelques hexobioses très fermentescibles, jusqu'aux souches attaquant jusqu'à 9 glucides dont plusieurs très peu fermentescibles. La réduction des nitrates en nitrites a été positive chez 6 souches et négative chez 8 souches. Mais c'est du côté du type fermentaire qu'il est possible de trouver un critère marqué, à la fois pour établir l'individualité de l'espèce et sa subdivision en trois variétés biochimiques.

Il a été établi ailleurs [43] que *F. fusiformis* est un ferment acéto-butyrique (acide principal : acétique). Tout au contraire, l'acide volatil principal chez *F. nucleatus* est l'acide propionique, l'acide secondaire étant le plus souvent l'acide valérianique (8 souches), moins souvent l'acide butyrique (4 souches), rarement l'acide formique (2 souches). L'acide acétique est toujours absent. Quant à l'acide lactique, il est produit par 12 souches sur 14. Nous pouvons donc envisager trois variétés biochimiques : la variété propionique-valérianique, la variété propionique-butyrique, la variété propionique-formique. Il se trouve que cette dernière présente en gélose profonde des colonies pigmentées en ocre rose et que nous pouvons individualiser celle-ci sous le vocable : *Fusiformis nucleatus*, var. *ochraceus*.

Voici l'étude faite par P. Tardieux, L. Joubert et F. de Cadore de cette variété :

En moins d'un an, deux souches d'une variété pigmentée de *F. nucleatus* ont été isolées dans le Service des Anaérobies.

La première, 1258 B, coexistait avec *V. parvula* et *Corynebacterium anaerobium* dans des crachats d'une tuberculeuse traitée chez laquelle était apparu un épisode fébrile.

La deuxième, 1411, a été isolée d'une plaie ulcéreuse et fistulisée de la base de la queue d'un chat mâle (par morsure d'un congénère). Cette infection avait entraîné la formation d'une vaste collection purulente pararachidienne. Les divers traitements chirurgicaux et anti-infectieux n'avaient apporté aucune amélioration.

L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et fermentaires a montré que ces deux souches étaient en tous points semblables. Elles se présentent l'une et l'autre sous l'aspect de bacilles en fuseaux, à extrémités effilées et à protoplasme granuleux, de 2 à 5 μ de longueur et 0,3 μ de largeur environ. Ces bacilles sont immobiles et ne présentent ni cils, ni spores, ni capsules, mais possèdent un corpuscule nucléaire très visible même sans coloration spéciale.

Anaérobies stricts et durables, ils sont toutefois peu réducteurs, ne virant ni le rouge neutre, ni la phénosafranine.

Leur développement en culture est lent et irrégulier. Il nécessite la présence de sérum et ne produit aucun dégagement de gaz ni d'odeur, bien qu'une faible quantité de SH_2 puisse être décelée

par le sous-acétate de plomb. Le caractère le plus marquant des cultures est l'apparition d'un pigment qui colore en une teinte allant de l'orange à l'ocre les colonies ouatées ou lenticulaires développées en gélose profonde VF, ou le sédiment de culture consécutif au trouble homogène du bouillon VF. La culture en eau peptonée est discrète et ne produit pas d'indol. Le lait, la gélatine, les protéines coagulées ne sont pas modifiés. Par contre, les glucides sont énergiquement fermentés avec production d'acides mais non de gaz. La fermentation du bouillon VF glucosé produit de l' NH_3 et de l' H_2S , des corps à fonction amine, aldéhyde et cétone, et les acides propionique, formique et lactique. Les nitrates sont réduits en nitrites.

Expérimentalement, les cultures sont dénuées de pouvoir pathogène et l'on ne peut déceler ni toxine, ni hémolysine.

En résumé, malgré la faiblesse du pouvoir réducteur et l'absence de fétidité et d'indol, ce fusiforme peut être rattaché à l'espèce *F. nucleatus* de Knorr. Ces quelques petites divergences et surtout l'aptitude à produire un pigment autorisent à le considérer comme une variété nouvelle.

IV. POUVOIR PATHOGÈNE. — A. Spontané.

a) *A l'état pur.* — Parmi les 14 souches étudiées, 5 ont été trouvées en culture pure dans les infections suivantes : abcès paraparotidien, pseudo-actinomyose pulmonaire, abcès massétérien après phlegmon dentaire, abcès hépatiques multiples mortels, abcès cutané chez un chat.

Ainsi, *F. nucleatus* est pathogène pour l'homme et les animaux par lui-même. Dans chacun des cinq cas, on a pu reconstituer le mécanisme de l'infection, qui est exactement le même, non seulement pour tous les Fusiformes, pour toutes les *Spherophoraceae*, mais pour tous les anaérobies endogènes non sporulés : 1° vie saprophytique dans la cavité buccale (quatre fois) ou dans l'intestin (une fois) ; 2° infection focale primitive (dentaire, trois fois ; buccale, une fois ; cœcale, une fois) ; 3° métastases, soit par contiguité (deux fois), soit à distance (deux fois), soit par inoculation (une fois).

Quant au substratum de ce pouvoir pathogène, il est jusqu'ici inconnu : pas d'exotoxine, pas d'hémolysine, pas d'endotoxine. Il s'agit vraisemblablement d'une virulence contingente, conditionnée par une modification accidentelle du terrain : accident de la dent de sagesse dans les cas 960 et 1210, atteinte cryptique du cæcum dans le cas 1474, morsure dans le cas 1411.

Il est à remarquer ce fait très intéressant, déjà observé avec *F. fusiformis* : à lui seul et en dehors de toute association *F. nucleatus* peut provoquer une suppuration à grains riziformes semblable aux actinomycoses, mais où on ne trouve jamais d'acti-

nomycètes. Prévot, Béal et Tardieux [14] ont proposé pour ces fausses actinomycoses le terme de pseudoactinomycoses et reconnu qu'elles pouvaient être causées soit par des *Ramibacterium*, soit par des *Corynebacterium*, soit par des Fusiformes.

b) *En association*. — Les neuf autres souches isolées ont été trouvées associées avec d'autres anaérobies dans les suppurations qu'elles avaient provoquées avec ces germes.

L'association avec des cocci anaérobies a été rencontrée quatre fois. L'association avec des *Corynebacterium* anaérobies a été rencontrée deux fois. L'association avec un *Spherophorus* a été observée une fois. L'association avec des Actinomycètes a été rencontrée quatre fois (trois fois avec des *Actinobacterium* anaérobie, une fois avec *A. bovis*). Dans ces cas là, il s'agissait d'actinomycoses vraies, et ces faits sont à rapprocher de ce que nous avons observé très souvent avec *F. fusiformis*, également très fréquent dans les suppurations actinomycosiques.

B. Expérimental.

Les seuls auteurs qui, avant nous, ont recherché le pouvoir pathogène expérimental de *F. nucleatus* sont Sussmann et Dicker [6]. Ils ont eu la chance de travailler avec une souche ayant conservé son pouvoir pathogène en culture : cobayes et lapins inoculés, soit avec le pus d'empyème, soit avec la culture, ont présenté des abcès locaux à pus grumeleux ne contenant que le germe inoculé. Nous avons été moins heureux dans nos recherches puisque 11 de nos souches avaient totalement perdu en culture tout pouvoir pathogène pour la souris et le cobaye (ce qui rapproche *F. nucleatus* de la majorité des anaérobies endogènes, non sporulés).

Par contre, trois de nos souches étaient pathogènes pendant les premiers temps après leur isolement.

La souche 313 E inoculée à la souris par voie intrapéritonéale tuait cet animal en quarante-huit heures par péritonite séro-hémorragique.

La souche 402 D inoculée par voie intraveineuse à la souris la tuait par infection généralisée, sans caractère anatomo-pathologique spécial, en trois jours.

Enfin, la souche 1474 isolée d'abcès multiples du foie découvants à l'autopsie par Caroli et ses collaborateurs [15] était pathogène pour le cobaye et le lapin.

Chez le cobaye, ce pouvoir pathogène doit être révélé par l'injection simultanée de mucine gastrique. Si l'injection est pratiquée par voie intramusculaire, les cobayes meurent lentement : cinq, dix-sept, dix-neuf jours, sans présenter de lésions locales caractéristiques, mais présentant tous un certain degré de congestion pulmonaire. Si l'injection est pratiquée par voie intrapéritonéale, la mort est en général plus rapide ; localement, on cons-

tate une péritonite purulente pariétale et viscérale, surtout hépatique. A distance, on constate un degré intense de congestion pulmonaire. Ces lésions sont envahies par les germes intestinaux, vraisemblablement d'extension *port mortem*.

Chez le lapin, l'injection intraveineuse de corps microbiens provoque une infection généralisée d'évolution lente, amenant la mort en trois semaines. A l'autopsie, on ne constate qu'une congestion intense de la vessie avec hémoglobinurie.

La salive n'est pas un meilleur adjuvant que la mucine : dans une expérience, 1 seul cobaye sur 4 est mort par cet artifice.

L'examen histopathologique des lésions du cobaye a été fait par J. Levaditi.

Du côté du foie on constate une hépatite toxi-infectieuse à prédominance médiolobulaire, caractérisée par un œdème inflammatoire des sinusoides dont les parois sont décollées, ainsi que par la dégénérescence vacuolaire (stéatose) et la nécrose de nombreuses cellules hépatiques. Hyperleucocytose intravasculaire. Infarctus avec nécrose centrale et couronne d'infiltration cellulaire inflammatoire nécrosée. Du côté de la rate : spléno-contraction et atrophie globale. Du côté du rein : une néphrite subaiguë et même chronique avec sclérose interstitielle prédominant dans la corticale et quelques cylindres hyalins. En résumé, hépatonéphrite infectieuse nécrotique rappelant les lésions observées sur le cadavre humain où a été isolée cette souche.

V. ANTIBIOGRAMME DE *F. nucleatus*. — Le comportement vis-à-vis des antibiotiques de 8 de nos souches a été établi. En voici les antibiogrammes :

679 H. Terramycine = chloromycétine = auréomycine > tétracycline > pénicilline > bacitracine.

854 x. Auréomycine = tétracycline > terramycine > chloromycétine > pénicilline.

952 B. Terramycine > chloromycétine > auréomycine > tétracycline > pénicilline.

960. Pénicilline = chloromycétine = auréomycine = tétracycline > terramycine > bacitracine = étrythromycine.

1210. Terramycine > chloromycétine = auréomycine > pénicilline > tétracycline.

1262 A. Chloromycétine > terramycine = tétracycline > auréomycine > pénicilline.

1371 B. Pénicilline > chloromycétine = auréomycine > terramycine = tétracycline > bacitracine.

1474. Chloromycétine > auréomycine = terramycine = tétracycline.

Cet antibiogramme se fait au mieux par la méthode des disques de Chabbert noyés au sein d'une gélose épaisse coulée entre le

couvercle renversé d'une boîte de Petri et la boîte elle-même également renversée et encastrée dans son couvercle, la dessiccation étant empêchée par une coulée de paraffine.

Malgré une apparence de diversité, ces antibiogrammes sont en réalité très homogènes, les cinq antibiotiques préférentiels étant les mêmes pour toutes les souches, soit : terramycine, chloromycétine, auréomycine, pénicilline et tétracycline. Leur ordre d'activité n'est pas toujours le même, mais il s'agit de très petites différences dans les zones d'inhibition, ne dépassant pas 3 mm de diamètre. Les autres antibiotiques sont peu ou pas actifs.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

I. *F. nucleatus* a été isolé dans 14 infections de l'homme et des animaux, dont cinq fois en culture pure et neuf fois en association avec d'autres anaérobies. L'une de ces infections fut mortelle et le germe y fut trouvé en culture pure.

II. L'habitat de *F. nucleatus* est le tube digestif (cavité buccale, cæcum et appendice).

III. Le granule chromaffine est bien un équivalent du noyau, constitué par un acide désoxyribonucléique ne nécessitant pas une coloration spécifique.

IV. L'ensemble des caractères cultureux et biochimiques de nos souches permet d'affirmer l'individualité de *F. nucleatus*, en particulier sa sérophilie obligatoire permanente, son absence de pouvoir gazogène et son type fermentaire où l'acide volatil principal est l'acide propionique (l'acide secondaire étant le plus souvent l'acide valérianique, moins souvent l'acide butyrique, rarement l'acide formique).

V. Une variété pigmentée à colonies ocre rose a été rencontrée deux fois, dont le type fermentaire est propionique-formique.

VI. Les infections focales initiales à *F. nucleatus* sont surtout des infections bucco-dentaires (en particulier des accidents de la dent de sagesse) et des amygdalites. Les métastases contiguës prennent la forme de suppuration maxillaire, génienne, parotidienne, cervicale et les métastases distantes peuvent atteindre le poulmon et la plèvre. Dans un cas d'infection focale appendiculaire, la métastase était endopéritonéale ; dans un cas d'infection focale cæcale, la métastase était hépatique et mortelle. Les anaérobies associés le plus fréquemment à *F. nucleatus* sont les *Actinobacterium*. L'infection est alors une véritable actinobactériose.

VII. La plupart des souches perdent leur pouvoir pathogène en culture. Certaines peuvent provoquer des infections mortelles de la souris, du cobaye et du lapin sans caractère spécifique : suppu-

rations à pus grumeleux, péritonites, souvent compliquées d'infections surajoutées en particulier du poumon.

VIII. Toutes les souches étudiées ont montré un comportement homogène vis-à-vis des antibiotiques, dont 5 sont très actifs, alors que les autres ne sont que peu ou pas actifs.

SUMMARY.

Fourteen strains of *F. nucleatus* have been isolated from human or animal infections. Their biological and cultural properties allow to confirm the individuality of this bacterial species. There exists also a pigmented variety, with ochre-rosa colonies.

The presence of a chromaffine granule is not a specific character. This granule is a nuclear-like formation, constituted by a desoxyribonucleic acid which does not need a special staining.

The germ is found in the digestive tract. Initial focal infections are especially located in the mouth, teeth or tonsils, which may give proximal or distal metastasis.

Most strains rapidly lose their pathogenicity in culture. One of them preserved its pathogenicity for rabbits and guinea-pigs, in which it gave fatal lesions; these lesions were macroscopically and microscopically similar to those of the human disease from which the strain had been isolated (fatal suppurative necrotic hepatitis).

All strains are sensitive to five antibiotics: penicillin, aureomycin, chloramphenicol, oxytetracyclin and tetracyclin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KNORR (M.). *C. Bakt. I. Org.*, 1923, **89**, 17.
- [2] PRÉVOT (A. R.). *Manuel de Classification des Anaérobies*. 1^{re} édition, Masson, 1940, page 190.
- [3] STANIER (R. Y.). *J. Bact.*, 1940, **40**, 619.
- [4] GRUMBACH (A.) et VERDAN (C.). *Arch. Hyg.*, 1935, **115**, 116.
- [5] LEMIERRE (A.), GRUMBACH (A.) et REILLY (J.). *Bull. Acad. nat. Méd.* 1936, **115**, 945.
- [6] SUSSMANN (O.) et DICKER (H.). *Münch. med. Wschr.*, 1938, 583.
- [7] DICKER (H.). *Z. Bakt. I. Org.*, 1938, **141**, 37.
- [8] ROBIN (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 258.
- [9] JACKINS (H. C.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 101.
- [10] OMATA (R. R.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 326.
- [11] PRÉVOT (A. R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 334.
- [12] PRÉVOT (A. R.) et MAZUREK (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 125.
- [13] PRÉVOT (A. R.) et TAFFANEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 420.
- [14] PRÉVOT (A. R.), BÉAL (G.) et TARDIEUX (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 903.
- [15] CAROLI (J.) et collaborateurs. *Rev. méd. chir. Mal. Foie*, 1956, **31**, 29.

ÉTUDES

SUR LES *E. COLI* DE GASTRO-ENTÉRITE INFANTILE

III. — ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DANS UN SERVICE HOSPITALIER DU NORD DE LA FRANCE

par R. BUTTIAUX, P. NICOLLE, L. et S. LE MINOR et B. GAUDIER (*).

(Instituts Pasteur de Lille et Paris)

Dans des articles précédents nous avons rapporté les propriétés biochimiques et antigéniques des *E. coli* 111 : B4, 55 : B5 et 26 : B6 [1], la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées avant 1953 [2], la lysotypie de ces bactéries [3] et les relations entre les types bactériophagiques, antigéniques et la sensibilité aux antibiotiques [4].

Nous rapporterons ici une étude épidémiologique des gastro-entérites infantiles (G.E.I.) à *E. coli* de types spécifiques dans le Nord de la France.

Nous avons, depuis plusieurs années, recherché systématiquement les sérotypes de *E. coli* de gastro-entérite dans les selles d'enfants des départements du Nord et du Pas-de-Calais, présentant ou non des signes intestinaux : les types 0111, 055 et 026 depuis 1950, les autres depuis leur date de description. Nous avons ainsi trouvé les types :

111 : B4 : 627 fois ; 55 : B5 : 121 fois ; 26 : B6 : 64 fois ; 86 : B7 : 4 fois ; 125 : B15 : 4 fois ; 126 : B16 : 1 fois.

Le type 127 : B8, recherché depuis 1955, n'a pas encore été rencontré. Nos investigations concernant le 128 : B12 ont débuté en février 1956 et ne sauraient intervenir dans cette statistique, qui montre la prédominance très nette du type 111 : B4.

Du 23 décembre 1952 au 1^{er} janvier 1956, 380 enfants âgés de 1 jour à 4 ans, ont été hospitalisés ou traités au cours de leur séjour dans le service de pédiatrie pour gastro-entérite aiguë.

Les *E. coli* G.E.I. ont été isolés des fèces de 200 d'entre eux. Le plus souvent, nous n'avons rencontré qu'un seul sérotype (au moins 10 colonies lactose positives de chaque échantillon de selles, ensemencées sur gélose lactosée au bromo-crésol pourpre, ont été

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

examinées) : 111 : B4 : 152 fois ; 55 : B5 : 18 fois ; 26 : B6 : 11 fois ; 86 : B7 : 1 fois ; 125 : B15 : 2 fois.

Parfois, deux sérotypes étaient associés : 111 : B4 + 55 : B5 : 9 fois ; 111 : B4 + 26 : B6 : 5 fois ; 111 : B4 + 86 : B7 : 2 fois.

Dans 7 cas, nous avons rencontré une association avec des *Salmonella* : 111 : B4 + *S. bareilly* : 5 fois ; 111 : B4 + *S. typhi murium* : 1 fois ; 55 : B5 + *S. bareilly* : 1 fois.

Chez deux malades, nous avons rencontré une association avec *Shigella sonnei* : chez l'un avec 111 : B4, chez l'autre avec 86 : B7.

Durant la même période, 15 enfants ont présenté une gastro-entérite imputable uniquement à des *Salmonella* (*S. bareilly* : 7 fois ; *S. paratyphi* B₁ : 14 fois ; *S. typhi murium* : 4 fois).

Dix autres manifestations semblables furent dues à des *Shigella* (*Sh. sonnei* : 8 fois, *Sh. flexneri* 6 : 2 fois).

Les pourcentages des diverses étiologies s'établissent donc ainsi :

Gastro-entérites à <i>E. coli</i> G.E.I. simples ou associés	52,6
Gastro-entérites à <i>Salmonella</i>	3,9
Gastro-entérites à <i>Shigella</i>	2,6

Les faits suivants sont à retenir :

1° La proportion des G.E.I. associées à des sérotypes particuliers de *E. coli* est nettement plus élevée dans notre statistique que dans celles des autres auteurs, où elle varie de 20 à 36 p. 100.

2° Le type 111 : B4 est le plus fréquent. Il a été isolé dans 158 cas ; il est présent dans les 16 cas d'association de plusieurs sérotypes. Les types 55 : B5 et 26 : B6 sont plus rares : 27 et 16 p. 100 respectivement. Les 86 : B7 et les 125 : B15 sont exceptionnels.

3° Dans 8 p. 100 des cas on trouve deux sérotypes associés. Les associations avec les *Salmonella* ou les *Shigella* sont plus rares (3,5 et 1 p. 100 des cas respectivement). Elles ont déjà été signalées par R. Mushin [5].

TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES.

Toutes nos souches ont été étudiées sous le rapport de leur sensibilité à une série de bactériophages (lysotypie).

Parmi les 111 : B4, nous avons rencontré 135 fois le lysotype Tourcoing, 19 fois le lysotype Sèvres, 10 fois le lysotype Bretonneau. Quatre souches n'ont pu être caractérisées.

Les lysotypes 55 : B5 se répartissent ainsi : lysotype Lomme : 24 ; lysotype Weiler : 2 ; non caractérisable : 1.

Les 26 : B6 enfin, appartiennent au lysotype Warwick : 4 fois ;

au lysotype Birmingham : 2 ; au lysotype Styrie : 1. Sept souches n'ont pu être caractérisées et 2 n'ont pu être examinées.

On remarque donc la prédominance massive du lysotype Tourcoing (135 sur 168) parmi les *E. coli* 111 : B4 dans le Nord de la France, et celle du lysotype Lomme (24 sur 27) parmi les 55 : B5.

Dans d'autres régions, il n'en est pas ainsi. A Lyon, notamment, c'est le lysotype Sèvres variété lyonnaise qui est de beaucoup le plus fréquent. A Paris, les deux lysotypes Tourcoing et Sèvres s'équilibrent à peu près.

ORIGINE DES CONTAMINATIONS.

Les auteurs qui ont, les premiers, étudié l'épidémiologie des gastro-entérites infantiles à *E. coli* avaient insisté sur la fréquence des contaminations à l'intérieur des crèches, des pouponnières ou des hôpitaux. Ils décrivaient la maladie comme un fléau épidémique affectant essentiellement les nourrissons de ces milieux. On s'est aperçu ultérieurement que les *E. coli* G.E.I. se trouvaient également dans des cas sporadiques. Cette notion soulevait la possibilité de contaminations extra-hospitalières. Ross [6] trouve ainsi, à leur entrée à l'hôpital, les sérotypes 111 : B4 et 55 : B5 chez 35,6 p. 100 des enfants atteints de troubles gastro-intestinaux. Rauss et coll [7] isolent ces mêmes sérotypes chez 31 p. 100 des sujets de moins d'un an et 13 p. 100 de ceux de plus d'un an, représentant des G.E.I. sporadiques. Hinton et coll. [8] font des constatations identiques pour 111 : B4 chez 24 des 47 malades lors de leur admission à l'hôpital. Alimanestianu-Butas et coll. [9] insistent également sur l'importance des cas sporadiques extra-hospitaliers.

Dans cette étude, nous avons considéré comme ayant été l'objet d'une contamination extra-hospitalière tout sujet présentant au moment de son entrée dans le service une diarrhée où ont été isolés un ou plusieurs sérotypes d'*E. coli* G.E.I. Nous considérons, au contraire, comme contaminés à l'intérieur de l'hôpital ceux qui présentaient les signes de la maladie ou qui éliminaient dans leurs selles ces sérotypes particuliers, plus de quarante-huit heures après leur admission. Chez eux, les symptômes cliniques apparaissent en moyenne cinq à six jours après celle-ci. Dans ces conditions, les 216 *E. coli* G.E.I. isolés au cours de notre étude se répartiraient ainsi :

Contamination extra-hospitalière :	88, soit	40,7 p. 100
Contamination intra-hospitalière :	111, soit	51,3 p. 100
Contamination non précisable :	17, soit	7,8 p. 100

Grönroos [10] trouve pour les contaminations extra- et intra-hospitalières les pourcentages de 32,2 et 67,8.

INFLUENCE DES SAISONS SUR LA FRÉQUENCE DE LA MALADIE.

Celle-ci ne peut rationnellement être étudiée sur la base des contaminations intra-hospitalières : l'introduction d'un cas de G.E.I. à *E. coli* dans un service d'enfants déclenche aussitôt des contaminations, quelle que soit la période de l'année. Nous nous sommes donc limités aux contaminations extra-hospitalières (tableau I).

TABLEAU I.

	Hiver	Printemps	Eté	Automne
111:B4	20	14	9	16
55:B5	7	4	1	8
26:B6		4		2
86:B7	1	1		
125:B15				1
Total	28	23	10	27

Ce tableau montre une égale fréquence de la maladie pendant les saisons les plus froides de l'année : automne, hiver, printemps, une fréquence nettement moindre en été.

AGE DES MALADES.

Parmi les 216 *E. coli* G.E.I. isolés, 13 seulement, soit 6 p. 100 l'ont été chez des malades de plus d'un an.

Nous avons remarqué une fréquence élevée des G.E.I. à *E. coli* chez les prématurés et les nourrissons issus de grossesse gémellaire.

FORMES CLINIQUES ET MORTALITÉ.

Les formes graves de la maladie se rencontrent surtout dans les infections à 111 : B4, quel qu'en soit le type bactériophagique. On les trouve dans près de la moitié des cas. Dans la région du Nord, le 55 : B5 est nettement moins pathogène. Au contraire, le 26 : B6 produit plus de 50 p. 100 de formes cliniques graves (toxicoose ou déshydratation). Il en est de même pour les *E. coli* G.E.I. associés entre eux ou à des *Salmonella*.

RECHUTES.

Elles peuvent relever de trois étiologies différentes :

1° Dans la majorité des cas (88 p. 100), elles surviennent deux à trois jours après l'arrêt du traitement. On retrouve dans les

selles des enfants le même sérotype et le même lysotype. Chez ces malades, la thérapeutique par les antibiotiques actifs *in vitro* à laquelle tous ont été soumis, a été poursuivie d'une façon insuffisante. Il en a été ainsi dans les formes bénignes où le médicament a été supprimé dès la disparition de la diarrhée. C'est ce qui explique la plus grande fréquence des rechutes dans les formes bénignes, les formes graves ayant été traitées plus énergiquement et plus longtemps.

2° Dans 12 p. 100 des cas de rechute, l'enfant a été contaminé à nouveau par un autre sérotype ou un autre lysotype du même sérotype, au cours de sa convalescence. Les symptômes de la rechute apparaissent alors plus tard, huit, dix ou même quinze jours après la guérison clinique. Dans ces cas, le terme de rechute est impropre, puisqu'il s'agit en réalité de réinfection. Il faut remarquer la facilité avec laquelle un nourrisson cliniquement et bactériologiquement guéri d'une gastro-entérite associée à la présence d'un sérotype déterminé d'*E. coli* refait une maladie semblable avec un autre sérotype. Ceci montre l'absence d'immunité croisée, tout au moins après un traitement précoce par les antibiotiques.

3° Il existe enfin des étiologies mixtes où les deux phénomènes précédents s'intriquent. Un nourrisson porteur d'un 111 : B4 lysotype Tourcoing fait une rechute huit à dix jours après l'arrêt du traitement. On retrouve dans les selles ce même germe et un 55 : B5 lysotype Lomme provenant d'un des malades de son proche voisinage.

ORIGINE DES CONTAMINATIONS AU COURS DES ÉPIDÉMIES.

1° *Epidémies intra-hospitalières* : De nombreux travaux ont montré la facilité et la rapidité avec laquelle les *E. coli* G.E.I. infectaient les nourrissons des crèches ou des services hospitaliers dès la pénétration dans ce milieu d'un malade ou d'un porteur éliminant ces bactéries. La lysotypie permet de repérer avec plus de précision que les biotypes ou la détermination de l'antigène H, l'origine d'une épidémie. Ainsi les 111 : B4 : H2, du biotype I, ont été subdivisés en 5 lysotypes.

De nombreux exemples nous ont convaincus de l'utilité de déterminer le type phagique de tous les *E. coli* G.E.I. que nous isolons. Nous n'en citerons que deux : au cours d'une poussée épidémique due au 111 : B4 : H2 lysotype Tourcoing, ayant affecté 18 nourrissons, du 17 mars 1954 au 23 avril 1954, est admis un enfant éliminant 111 : B4 : H2 lysotype Sèvres. Dans les jours suivants, on observe 7 nouveaux cas dus au lysotype Tourcoing et 3 autres au lysotype Sèvres.

Au cours d'une autre épidémie à 111 : B4 type Tourcoing sur-

viennent des gastro-entérites à 111 : B4 type Bretonneau. Les examens systématiques montrent que ce dernier type a été introduit par un porteur de germes ne présentant pas de signes intestinaux et admis sept jours auparavant dans le service. De tels faits incitent à recommander, ainsi que Rogers et Koegler [41] l'ont conseillé, de pratiquer une coproculture systématique chez tous les enfants, dès leur entrée dans les crèches ou hôpitaux.

Bien qu'Anderson et coll [42] rapportent qu'il n'y eut pas de différence sensible entre les infections croisées relevées dans deux services hospitaliers, l'un appliquant strictement les mesures d'hygiène, l'autre n'ayant pas la possibilité de le faire, les mesures prophylactiques et en particulier l'isolement rigoureux des malades dès leur entrée [43], améliorent en général la situation. Rappelons qu'en France la déclaration des toxicoses infectieuses du nourrisson est obligatoire [44].

La prophylaxie par l'administration systématique d'antibiotiques, comme l'ont préconisée Todd et Hall [45] avec le chloramphénicol, J. Marie et coll. [46] avec l'association néomycine-bacitracine, amène indubitablement une diminution importante du nombre des contaminations intra-hospitalières. Malheureusement, dans les services où une telle prophylaxie est employée, des souches résistantes aux antibiotiques ne tardent pas à apparaître et la méthode devient inefficace. C'est pourquoi la proposition d'Anderson et coll. nous semble actuellement la plus rationnelle : seuls seraient traités à l'hôpital les cas graves nécessitant des soins particuliers ; ceux-ci seraient isolés dans des cellules individuelles et confiés aux soins d'un personnel spécial n'ayant pas accès aux autres parties du service de pédiatrie. Tous les autres cas de G.E.I. à *E. coli* seraient traités à domicile.

2° *Epidémies extra-hospitalières* : Il existe vraisemblablement de véritables poussées épidémiques dans des quartiers urbains, ainsi que le montre l'exemple suivant : du 5 août 1953 au 9 septembre 1953, 6 nourrissons atteints de G.E.I. à *E. coli* 111 : B4 : H2 lysotype Tourcoing sont admis dans le service de pédiatrie. Or, tous ces malades provenaient du même quartier d'une grande ville du Nord. Leurs domiciles étaient distants de 500 à 1 100 m et la contamination par contact direct a pu être éliminée par l'enquête. La contamination par le lait et l'eau semble peu probable et son origine est actuellement inconnue.

La marche des épidémies dans les diverses parties d'une région peut être illustrée par l'exemple suivant :

Le 31 janvier 1955, nous trouvons pour la première fois, dans les selles d'un nourrisson atteint de gastro-entérite infantile aiguë grave admis à l'hôpital de Béthune (Pas-de-Calais), un type bio-

chimique particulier d'*E. coli* O 111 : B4 lysotype Tourcoing ; il s'agit d'une souche rigoureusement anaérogène, conservant ce caractère après de très nombreux passages sur milieux de culture liquides et solides. Cette propriété « marque » donc cette variété biochimique du lysotype ; elle n'a jamais été observée jusqu'alors dans notre région et n'est pas décrite à notre connaissance dans la littérature mondiale. Elle détermine cinq gastro-entérites aiguës dans l'hôpital de Béthune, en dix jours, et se montre donc agressive. Le 14 avril 1955 entre à l'hôpital de Lens un nourrisson, fils d'un marchand ambulant fréquentant le marché de Béthune, distant de 18 km de cette localité ; il présente une gastro-entérite avec toxicose ; il est évacué sur le Service de Pédiatrie de la Cité Hospitalière de Lille ; nous trouvons dans ses selles le même 111 : B4 lysotype Tourcoing anaérogène que celui décelé en janvier 1955 à Béthune. L'entrée du nourrisson ainsi infecté dans notre Service entraîne du 16 mai 1955 au 21 juin 1955 4 cas de toxicose ; nous isolons dans les fèces de ces malades la même variété de 111 : B4. Depuis ce jour, nous n'avons plus jamais rencontré ce type anaérogène dans notre région.

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET SULFAMIDES DES *E. coli* 111 : B4

Certains auteurs étrangers ont mis en doute l'efficacité réelle de l'antibiothérapie dans les gastro-entérites infantiles où sont isolés des *E. coli* G.E.I. Elle est pourtant utilisée dans tous les pays avec des résultats le plus souvent favorables jusqu'ici.

Nous avons recherché la sensibilité des souches isolées par nous aux antibiotiques suivants : streptomycine, chloramphénicol, oxy-tétracycline, chlortétracycline et néomycine (depuis septembre 1954, seulement pour cette dernière). De même, nous avons étudié leur comportement en présence des sulfamides : septoplix, rufol, thiazomide et adiazine. Nous avons utilisé à cet effet la méthode de diffusion sur gélose, par cupules ou disques [17]. Avec Chabbert, certains d'entre nous [2] ont déjà signalé l'aspect général de l'antibiogramme des *E. coli* G.E.I. Nous voulons insister ici sur l'évolution de leur sensibilité de 1952 à 1955. En réunissant les souches isolées par groupe de 27, les résultats obtenus sont plus significatifs ; ils sont décrits dans le tableau II et concernent uniquement les O 111 : B4.

On s'aperçoit ainsi que, du début de 1953 à la fin de 1955, 96,2 p. 100 des *Escherichia coli* O 111 : B4 d'origine intra ou extra-hospitalière sont devenus résistants aux antibiotiques et sulfamides les plus habituellement utilisés durant cette période. Par contre, ils étaient restés sensibles à la néomycine dont l'utilisation avait débuté en octobre 1954. On constatait pourtant dès le mois de septembre 1955, l'apparition de quelques souches moins sensibles à

TABLEAU II.

	23/12/52 au 5/8/53	10/8/53 au 1/3/54	1/3/54 au 27/4/54	5/5/54 au 23/9/54	24/9/54 au 4/4/55	5/4/55 au 15/9/55
Nombre de souches de 111:B ₄	27	27	27	27	27	27
Souches résistantes à tous les antibiotiques et sulfamides (x)	0	5	6	11	21	26
Pourcentage des souches résistantes	0	18,5	22,2	40,7	77,7	96,2
Souches résistantes à la Néomycine					0	0

(*) Souches résistantes à 100 µg/ml de streptomycine, chloramphénicol, chlortétracycline, oxytétracycline et à 1 000 µg/ml de septoplax, thiazomide, rufol, adiazine.

cet antibiotique ; au moment de la rédaction de ce travail, en avril 1956, 70 p. 100 des 111 : B₄ éprouvés sont devenus résistants à 100 mcg/cm³ du produit.

Les autres sérotypes d'*E. coli* G.E.I. moins nombreux dans notre région sont, au contraire, restés sensibles aux sulfamides et à tous les antibiotiques signalés ci-dessus.

DURÉE DU PORTAGE CHEZ LES MALADES TRAITÉS PAR DES ANTIBIOTIQUES ACTIFS

Chacun de nos malades a été soumis à des coprocultures de contrôle pratiquées quatre jours après l'arrêt du traitement, celui-ci coïncidant en général avec la guérison clinique. En dehors des cas où la persistance du germe a déclenché une rechute, certains sujets guéris ont continué à éliminer ce dernier sans présenter de nouvelles manifestations pathologiques. Ces porteurs sains sont au nombre de 11 parmi nos 200 malades (5,5 p. 100).

La durée du portage a été au maximum de vingt à trente jours dans 3 cas, de trente à quarante-cinq jours dans 2 autres. Mais nos recherches dans d'autres services de la région du Nord montrent qu'elle peut atteindre parfois douze mois.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Durant les années 1953, 1954 et 1955, nous avons recherché systématiquement les sérotypes particuliers d'*Escherichia coli* associés aux gastro-entérites infantiles chez les 380 enfants âgés de

un jour à quatre ans, atteints de cette maladie et admis dans le Service de Pédiatrie du Centre Hospitalier de Lille. Nous les avons isolés chez 52,6 p. 100 d'entre eux. Les *Salmonella* intervenaient seules dans 3,9 p. 100 et les *Shigella*, seules, dans 2,6 p. 100 des cas. Deux sérotypes d'*E. coli* G.E.I. étaient associés 16 fois chez le même sujet.

Le sérotype 111 : B4 est de beaucoup le plus fréquent ; il a été isolé 168 fois. Les O 55 (27 fois) et O 26 (16 fois) le sont moins ; les O 86 et O 125 sont exceptionnels.

La lysotypie permet de reconnaître parmi les O 111, O 55 et O 26 des types ayant une sensibilité particulière et constante à certains bactériophages. Comme pour l'étude épidémiologique des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, elle fournit ici d'excellents et précieux renseignements. Parmi les O 111, le lysotype Tourcoing est le plus fréquent (135) ; il en est de même pour le lysotype Lomme (24) chez les O 55.

Les infections des nourrissons peuvent être d'origine intra ou extra-hospitalière. Les premières ont été observées dans 51,3 p. 100 et les secondes dans 40,7 p. 100 des cas. L'origine n'a pu être précisée dans 7,8 p. 100 d'entre elles.

Les contaminations extra-hospitalières ont une égale fréquence en hiver, automne et printemps. Elles sont nettement plus rares en été.

Les sérotypes particuliers d'*E. coli* se rencontrent presque exclusivement dans les gastro-entérites des nourrissons de un jour à un an ; dans notre étude, ils atteignaient surtout ceux de un à quatre mois. Ils sont rares chez les malades de plus d'un an.

La gastro-entérite infantile à *E. coli* survient avec une plus grande fréquence (toute proportion gardée) chez les prématurés et à la suite d'accouchements gémellaires.

Les formes graves se rencontrent surtout dans les infections par le O 111. Dans notre région, le O 55 paraît moins agressif ; mais le O 26 produit plus de 50 p. 100 de formes graves. N'importe quel lysotype des O 111, O 55 et O 26 peut être associé à ces dernières.

Les malformations congénitales, les infections contemporaines, les hypotrophies et carences ont une importance considérable sur la sévérité de la gastro-entérite et sa mortalité ; elles les exagèrent très nettement.

La mortalité est surtout élevée dans les toxicoses et les gastro-entérites avec déshydratation des nourrissons de 1 à 15 jours (33,3 et 50 p. 100 des cas) ; les enfants plus âgés résistent mieux. Les formes simples sont peu meurtrières, mais les rechutes y sont plus fréquentes ; elles surviennent le plus souvent après un traitement par les antibiotiques insuffisamment prolongé ; il faut les distinguer des réinfections produites par un autre lysotype du

même sérotype ou par un sérotype différent ; nous les avons observées chez 12 p. 100 de nos malades.

La lysotypie permet d'étudier avec plus de sûreté l'origine des contaminations au cours des épidémies. De nombreux exemples de notre étude montrent la facilité et la rapidité des infections intra-hospitalières. L'arrivée dans un service d'un nourrisson éliminant un *E. coli* G.E.I. entraîne dans les cinq à six jours suivants (temps d'incubation habituel) des gastro-entérites aiguës chez les sujets de son voisinage jusque-là indemnes. Ce phénomène incite à recommander une coproculture systématique chez tous les entrants des Services de Pédiatrie ou des crèches. Les porteurs de germes sains, enfants ou adultes, sont les vecteurs les plus importants de ces *E. coli* G.E.I. ; la durée du portage peut atteindre douze mois chez les sujets guéris. L'étude des cas extra-hospitaliers montre que la gastro-entérite infantile à *E. coli* affecte souvent aussi la forme épidémique en dehors des collectivités d'enfants. Des études ultérieures sont nécessaires pour en déceler l'origine ; certains aliments comme le lait et l'eau contiennent parfois les sérotypes particuliers en cause, mais trop rarement pour les considérer jusqu'ici comme des facteurs fréquents de l'épidémie. Le plus souvent, ces sérotypes isolés en dehors de l'organisme des nourrissons fournissent à la lysotypie des images anormales de réactions aux bactériophages.

Toutes les souches de O 111 isolées dans les huit premiers mois de 1953 étaient sensibles aux sulfamides et à la majeure partie des antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, oxytétracycline, chlortétracycline) ; dès avril 1955, 96,2 p. 100 d'entre elles étaient résistantes à tous ces produits, sauf à la néomycine ; la résistance à ce dernier antibiotique se rencontre en avril 1956 chez 70 p. 100 des O 111 isolés dans notre région. Ce phénomène rend vaine actuellement, dans notre Service, l'utilisation des antibiotiques comme moyen prophylactique de lutte contre l'infection.

N. B. — Les constatations d'ordre plus spécialement clinique faites au cours de cette étude sont publiées par ailleurs (*Arch. Maladies Appareil digestif*, 1956, **45**, 225). Certaines d'entre elles ont été utilisées pour la rédaction de ce résumé.

SUMMARY.

In 1953, 1954 and 1955, *E. coli* associated with infantile gastro-enteritis were found in the North of France in 52,6 % of the stools of 380 children aged one day to four years, suffering from acute gastro-enteritis. Type O 111 is the most frequent (168) ; O 55 (27) and O 26 (16) are less frequent ; O 86 and O 125 are

exceptional. These serotypes are sometimes associated with one another or with *Salmonella* or *Shigella*.

Infections happen in the hospital (51,3 %) or outside (40,7 %) ; the latter are most frequent during the cold season.

The particular serotypes of *E. coli* are almost exclusively found in infants aged one day to one year. In severe forms, types O 111 and O 26 are predominant. Recidives or reinfections with other types may happen.

Phage-typing allows the diagnosis of O 111, O 55 and O 26. It is very useful for the study of the epidemiology ; this method demonstrates how easily and rapidly contaminations happen within the hospital. Infections which originate outside the hospital also have an epidemic character and their vectors are still unknown.

Type O 111 bacteria isolated have progressively become resistant to all antibiotics (chloramphenicol and the group of tetracyclines) and the usual sulfanilamide. The proportion of resistant strains, zero in 1952, was 96,2 % in 1955.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LE MINOR (S.), LE MINOR (L.), NICOLLE (P.) et BUTTIAUX (R.). *Ann. Institut Pasteur*, 1954, **86**, 204.
- [2] CHABBERT (Y.), LE MINOR (S.), LE MINOR (L.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 175.
- [3] NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), BUTTIAUX (R.) et DUCREST (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 480 et 483.
- [4] NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et BUTTIAUX (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 462
- [5] MUSHIN (R.). *Med. J. Australia*, 6 juin 1953, 807.
- [6] ROSS (C. A. C.). *Glasgow Med. J.*, 1952, **33**, 441.
- [7] RAUSS (K.), GYURGESI (L.) et UJVARY (G.). *Acta Med. Budapest*, 1953, **4**, 129.
- [8] HINTON (N. A.), NILLES (J. E.) et REED (C. B.). *Canad. J. med. Sci.*, 1953, **31**, 431.
- [9] ALIMANESTIANU-BUTAS (C.), POTVIN (E.) et LACHANCE (W.). *Canad. J. publ. Health*, 1953, **44**, 245.
- [10] GRÖNROOS (Y. A.). *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae*, 1954, **32**, suppl. 4.
- [11] ROGERS (K. R.) et KOEGLER (S. J.). *J. Hyg.*, 1951, **49**, 152.
- [12] ANDERSON (T.), CROCKATT (H.) et ROSS (C. A. C.). *J. Path. Bact.*, 1954, **68**, 1.
- [13] LONDON (G. M.). *Edinburgh Med. J.*, 1954, **61**, 84.
- [14] CATHALA (J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1954, **138**, 206.
- [15] TODD (R. Mc L.) et HALL (E. G.). *Brit. Med. J.*, 20 juin 1953, 1359.
- [16] MARIE (J.), SALET (J.), LE MINOR (L.), BECKMAN (M.) et PAYET (G.). *Semaine des Hôpitaux*, 1955, **31**, 2243.
- [17] CHABBERT (Y.). *Ann. Biol. méd.*, 1951, **9**, 544.

INTERFÉRENCE DE LA RIBONUCLÉASE AVEC LA MULTIPLICATION DU VIRUS POLIOMYELITIQUE EN CULTURES CELLULAIRES *IN VITRO*

par G. BARSKI et FR. CORNEFERT (*).

(Centre de Recherches d'Immunopathologie,
Hôpital Saint-Antoine, Paris
et Institut Pasteur, Service des Virus)

On sait que la ribonucléase agissant sur une cellule vivante et même sur une cellule fixée diminue sa basophilie et en particulier sa pyroninophilie. Son action à l'égard des acides ribonucléiques est spécifique et sélective à tel point qu'on a pu la mettre à profit dans une réaction cytochimique de différenciation entre les acides ribo- et désoxyribonucléiques (Brachet [4]).

Dans les cellules vivantes, l'action directe de la ribonucléase peut se traduire par des anomalies mitotiques, comme l'ont vu sur des méristèmes apicaux de racines Kaufman et Das [2], ou par une inhibition de synthèse protéique observée par Brachet sur les racines d'oignon et sur des protozoaires [3, 4].

M. Chèvremont et S. Chèvremont-Combaire ont démontré en cultures *in vitro* de fibroblastes et de myoblastes d'embryon de poulet, que la ribonucléase inhibe fortement la croissance de ces cultures et diminue le nombre des mitoses. Cet effet est accompagné d'une diminution générale de la basophilie cellulaire et de l'apparition de nombreux noyaux d'aspect prémitotique. Ces auteurs ont employé d'assez fortes concentrations de ribonucléase, mais la spécificité de son action semble être confirmée par la suppression de celle-ci obtenue à l'aide d'une préparation d'acides ribonucléiques de levures.

L'action de la ribonucléase sur des cellules atteintes par une infection virale a été étudiée dernièrement par Casterman et Jeener [6] sur des feuilles de *Nicotiana tabacum* infectées avec le virus de la mosaïque du tabac et par M^{lle} Le Clerc [7] sur des fragments de membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés de poule infectés avec le virus grippal. Dans les deux cas, on

*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1956.

a pu constater une inhibition plus ou moins prononcée de la synthèse du virus.

Dans le présent travail, en utilisant un virus cytopathogène, nous avons voulu étudier parallèlement l'action de la ribonucléase sur la multiplication du virus et sur l'évolution des lésions qu'il provoque dans les cellules infectées, *in vitro*. Nous avons choisi le virus de la poliomyélite qui contient uniquement des acides ribonucléiques [8, 9], à l'exclusion de DRN.

Nous l'avons choisi également pour la facilité avec laquelle on identifie les lésions cellulaires consécutives à l'infection. Elles ont été décrites en détail précédemment [10, 11].

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

CULTURES CELLULAIRES. — Nous préparons nos cultures à partir de suspensions de cellules trypsinées de rein de singe (cynocéphales) d'après les méthodes habituelles [12].

Le milieu de culture est constitué de solution 199 de Parker (50 p. 100) [13], de solution de Hanks (47 p. 100) et de sérum de cheval (3 p. 100).

La suspension cellulaire contenant 500 000 cellules environ par centimètre cube est répartie dans des tubes aplatis à lamelle du modèle habituel [14]. Elle donne lieu à une croissance épithéliale en couche essentiellement monocellulaire étalée à la surface de la lamelle. On observe les cultures au faible grossissement à travers les parois du tube, et, à différents stades de l'expérience, on les retire des tubes pour les fixer et les colorer, en titrant la teneur en virus du milieu surnageant de ces mêmes cultures.

Toutes les cultures devant fournir des préparations sont traitées rigoureusement de la même manière : fixées pendant une heure et demie au Carnoy, puis colorées par une solution de bleu de toluidine à 1 p. 100 pendant une heure et demie, et enfin montées après différenciation de cinq minutes à l'alcool absolu. Nous avons eu recours accessoirement à d'autres colorations, notamment à celle de Unna-Pappenheim.

VIRUS. — Au cours des expériences rapportées ici, nous avons employé seulement la souche de poliomyélite Mahoney de type I, préparée en stock et diluée avant l'emploi de façon à obtenir une suspension virale contenant 10^{-5} DI₅₀ (pour cultures cellulaires) dans 1 cm³.

Les échantillons de liquide de culture dont la teneur en virus devra être déterminée, sont congelés immédiatement après prélèvement et maintenus jusqu'au moment de leur titrage à -70° C.

Les titrages effectués en cultures cellulaires comportent par dilution au moins 4 unités (cultures) parallèles, le titre étant calculé d'après la méthode de Reed et Muench.

RIBONUCLÉASE. — Nous utilisons la ribonucléase-GBI-(General Biochemical), en solution dans le milieu de culture mentionné plus haut.

RÉSULTATS.

ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LES CULTURES D'ÉPITHÉLIUM RÉNAL DE SINGE NON INFECTÉ. — En faisant agir d'une façon continue la ribonucléase à 1 p. 1 000 sur les cultures, on observe, même au faible grossissement du microscope, quelques modifications par rapport aux cultures témoins au bout de quarante-huit heures ou plus tard. Les cultures traitées paraissent en général moins denses et la pellicule cellulaire plus mince.

Après fixation et coloration, cette différence apparaît beaucoup plus clairement, comme le montre la comparaison des figures 1 et 3. Dans les cultures avec ribonucléase, les nucléoles, moins intensément colorés (au bleu de toluidine ou à la pyronine), sont parfois à peine visibles. En revanche, les granulations chromatiniennes, plus apparentes que dans les cultures témoins, prennent fréquemment l'aspect granulo-filamenteux rappelant des cellules en prophase.

Nous constatons ces modifications constamment dans toutes les cultures d'épithélium rénal traitées de cette manière avec l'enzyme. Ces altérations ne prennent pourtant jamais un caractère généralisé et on observe toujours à côté de cellules atteintes groupées en foyers, d'autres d'aspect normal. Avec des concentrations de ribonucléase plus faibles, de l'ordre de 100 μ g par centimètre cube, les effets de l'enzyme sont encore beaucoup plus nuancés.

ACTION DIRECTE DE LA RIBONUCLÉASE SUR LE VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE. — Nous avons fait agir à 36° C pendant deux à cinq jours, la ribonucléase à la concentration de 1 p. 1 000 sur une suspension de virus titrant 10^5 DI₅₀ par centimètre cube. La dégradation du pouvoir infectant de cette suspension se poursuit alors essentiellement de la même façon en présence aussi bien qu'en absence de l'enzyme. Les titres sont en DI₅₀, $10^{3,5}$ après cinquante-deux heures et $10^{2,75}$ après cent seize heures d'incubation avec ribonucléase, et respectivement 10^3 et $10^{2,75}$ dans les mêmes conditions sans ribonucléase.

Nous avons obtenu dans une autre série d'expériences des résultats analogues à la température ambiante.

ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LES CULTURES INFECTÉES AVEC LE VIRUS. — Nous avons utilisé pour ces essais des cultures de rein de singe de huit jours qui montrent à ce moment une pellicule de cellules épithéliales particulièrement abondante et uniforme. Ces cultures sont partagées en quatre lots, chacun de 12 unités au moins. Les deux premiers comportent un lot témoin et un autre infecté avec le virus. Les deux lots restants sont traités à la ribonucléase à 1 p. 1 000 introduite avec le milieu de culture et agissant pendant toute la durée de l'expérience, c'est-à-dire pendant cent seize heures. Un de ces deux lots est infecté avec le virus, l'autre sert de témoin.

Le virus est introduit dans les cultures traitées à la ribonucléase ainsi que dans les témoins vingt-quatre heures après le début de l'expérience. Cette opération consiste à incuber les cultures pendant vingt minutes avec une suspension virulente contenant 10^5 DI₅₀ par centimètre cube ; on rince ensuite la culture cinq fois de suite avec un excès de solution de Hanks. Toutes les cultures témoins subissent le même traitement (ringage).

Nous faisons nos observations à la vingt-huitième, quatre-vingt-douzième et cent dixième heure après l'introduction du virus. Parallèlement à la fixation des cultures étalées sur lamelles, nous prélevons le liquide surnageant pour titrage.

Nos constatations sont les suivantes :

C'est au quatrième jour après l'infection que la différence entre les cultures traitées et non traitées avec la ribonucléase apparaît le plus distinctement. Tandis que dans les cultures normales toutes les cellules sans exception sont atteintes par le virus et montrent des lésions caractéristiques plus ou moins avancées (fig. 2), les cultures traitées à la ribonucléase présentent un aspect beaucoup moins homogène (fig. 4) : à côté de cellules atteintes présentant des lésions caractéristiques (noyau pycnotique, le plus souvent aplati et refoulé vers la périphérie de la cellule, centre cellulaire hypertrophié) on observe de nombreuses cellules apparemment non atteintes par le virus. Les cellules qui échappent à la destruction virale n'ont pourtant pas un aspect normal. Elles présentent habituellement les mêmes altérations que nous venons de décrire pour les cultures témoins non infectées, traitées à la ribonucléase : pâlissement ou disparition des nucléoles, coloration intense des granulations chromatiniennes du noyau. Il y a encore à la quatre-vingt-douzième heure dans les cultures traitées à la ribonucléase de très nombreuses cellules qui survivent à l'infection poliomyélitique. Elles deviennent beaucoup plus rares à la cent dixième heure. Le titrage des liquides de culture à ces différents stades donne les résultats suivants :

A la vingt-huitième heure, le titre est le même dans les cultures

avec et sans ribonucléase. A la quatre-vingt-douzième heure, il est au maximum : $10^{7,75}$ DI_{50} dans les témoins et $10^{6,25}$ seulement dans les cultures traitées à l'enzyme. Puis il baisse dans les témoins et continue encore à remonter légèrement dans les cultures avec ribonucléase.

Ainsi, à la quatre-vingt-douzième heure, au moment où nous constatons la différence la plus marquée dans l'aspect des cultures, on met en évidence également l'écart le plus considérable (1,5 log.) de titre de virus dans le milieu surnageant de ces cultures.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

Nos observations sur les cellules d'épithélium rénal normal de singe adulte soumis à l'action de la ribonucléase sont analogues à celles faites par M. et S. Chevrement sur des fibroblastes et des myoblastes d'embryon de poulet.

Nous retrouvons dans nos cultures les mêmes images de palissement et de désagrégation des nucléoles jusqu'à leur effacement complet, ainsi que des aspects prophasiques du réseau chromatinien.

Ainsi, la notion de l'accessibilité de la cellule vivante à l'action d'une ribonucléase exogène, notion établie jusqu'ici pour les cellules végétales [2, 3], les protozoaires [4] et les cellules du mésenchyme embryonnaire [5], se trouve étendue aux cellules épithéliales en provenance d'un animal adulte.

Quant à la pénétration de grosses molécules d'enzyme à l'intérieur des cellules, la pinocytose observée *in vitro* par plusieurs auteurs [15, 16] sur les cellules épithéliales de différentes origines peut dans ce cas particulier nous aider à en comprendre le mécanisme.

L'inégalité de réponse à la ribonucléase qu'on constate dans une population cellulaire apparemment homogène est due peut-être aux différences individuelles qui existent entre les cellules en ce qui concerne leur faculté d'incorporer les éléments du milieu liquide extérieur non plus par diffusion mais par pinocytose.

Si on admet que la pénétration de la ribonucléase se produit en fonction de l'activité biologique propre de la cellule plutôt que par un mécanisme purement physico-chimique, on peut s'expliquer plus aisément aussi la nécessité d'utiliser des concentrations de l'enzyme aussi élevées.

L'absence d'action directe de la ribonucléase sur le virus de la poliomyélite que nous constatons confirme les données de Dulbecco et Vogt [17] concernant le même virus ainsi que les observations de M^{lle} Le Clerc sur un autre virus à structure ARN, le virus de la grippe [7].

Ce n'est donc pas la particule de virus extracellulaire, complète et infectante, qui est susceptible d'être attaquée par la ribonucléase.

L'interférence de l'enzyme avec le virus ne se produit visiblement qu'au cours du processus infectieux intracellulaire quand elle peut s'exercer vis-à-vis des acides ribonucléiques viraux ou cellulaires libres. Ce fait est confirmé parallèlement par les observations cytologiques et les titrages de virus libéré par les cellules. Vingt-huit heures après l'introduction du virus, on n'observe pas de différence entre les cultures traitées à la ribonucléase et les cultures témoins, ni du point de vue de l'intensité des lésions, ni de celui du titre du virus.

Plus tard seulement, vers la quatre-vingt-douzième heure, au moment où toutes les cellules immédiatement « disponibles » pour l'infection sont déjà détruites et le virus produit par ces cellules libéré, on observe, d'une part, qu'un nombre important de cellules dans les cultures traitées à la ribonucléase résiste à l'infection, et, d'autre part, que le titre du virus dans ces cultures est environ trente fois plus bas que dans les cultures témoins.

La résistance de ces cellules au virus n'est pas absolue et définitive puisque par la suite, à cause très probablement de la dégradation de l'enzyme, ces cellules finissent par succomber à l'infection et le titre continue à remonter encore dans ces cultures au moment où il a dépassé déjà son point maximum dans les cultures témoins.

Comme on le voit, nos constatations diffèrent sur certains points des observations de J. Le Clerc faites sur des fragments de membrane chorio-allantoïdienne infectée avec le virus grippal. Dans nos expériences, nous n'avons pas pu bloquer complètement la multiplication du virus à travers toute la culture, comme l'a fait J. Le Clerc.

Deux explications sont possibles : l'une implique la différence qui peut exister entre les deux tissus (tissu embryonnaire de poulet et épithélium rénal de singe adulte) dans leur perméabilité à la ribonucléase, l'autre concerne une différence possible dans le mécanisme de synthèse intracellulaire de ces deux virus.

Des expériences utilisant d'autres virus et d'autres systèmes cellulaires sont nécessaires pour expliquer les causes réelles de cette divergence.

SUMMARY.

A 0,1 % solution of crystalline ribonuclease in a nutritive medium produces characteristic changes in the monkey kidney cell cultures *in vitro*. These changes do not appear uniformly

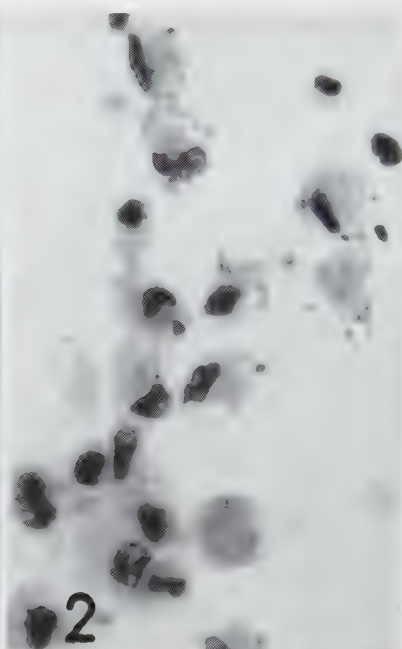
in the cell population, but are restricted to foci in which cells present altered nuclei with very weakly stained nucleoli and often marked prophase-like chromatinic granulations.

No direct action of the 0,1 % ribonuclease solution can be demonstrated on the poliomyelitis virus suspension. In monkey kidney cell cultures pretreated during 24 h. with ribonuclease and then infected with poliomyelitis virus, the rate of virus release is at first (28 h. titration) the same as in the control cultures, but slows down later : after 92 h. the titer of the virus is 1,5 log lower in the presence of ribonuclease.

In fixed and stained preparations of 92 h. cultures, all cells are destroyed by the virus in control cultures, whereas in the ribonuclease treated ones, group of cells resisting to the cytopathogenic virus action are still present. The nuclei of these cells show the characteristic ribonuclease induced changes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRACHET (J.). *Quart. J. Micros. Sci.*, 1953, **94**, 1.
- [2] KAUFMAN (B. P.) et DAS (N. K.). *Carnegie Inst. Washington*, 1953, **52**, 238 (cité d'après M. Chevrement et S. Chevrement-Comhaire).
- [3] BRACHET (J.). *Nature*, 1954, **174**, 876.
- [4] BRACHET (J.). *Nature*, 1955, **175**, 851.
- [5] CHEVREMENT (M.) et CHEVREMENT-COMHAIRE (S.). *C. R. Assoc. Anat.*, Nancy, 1955.
- [6] CASTERMAN (C.) et JEENER (R.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 433.
- [7] LE CLERC (J.). *Nature*, 1956, **177**, 578.
- [8] SCHWERDT (C. E.) et SCHAFFER (F. L.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, **61**, 740.
- [9] STANLEY (W. M.). Communication personnelle.
- [10] BARSKI (G.), ENDO (M.) et MONACI (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 264.
- [11] BARSKI (G.), ROBINEAUX (R.) et ENDO (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **88**, 57.
- [12] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
- [13] MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **73**, 1.
- [14] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 512.
- [15] LEWIS (S. R.), POMERAT (C. M.) et EZELL (D.). *Anat. Record.*, 1949, **104**, 487.
- [16] POMERAT (C. M.). Communication personnelle.
- [17] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, **61**, 790.



LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Une culture normale de cellules rénales de singe.

FIG. 2. — La même culture quatre-vingt-douze heures après infection avec le virus poliomyélitique.

FIG. 3. — Une culture de cellules rénales de singe restée pendant cent seize heures en présence de ribonucléase.

FIG. 4. — Une culture de cellules rénales de singe traitée par la ribonucléase pendant cent seize heures et infectée avec le virus poliomyélitique depuis quatre-vingt-douze heures.

(Figures 1-4, coloration au bleu de toluidine. Grossissement à la reproduction : mille quatre cents fois).

UTILISATION DES CULTURES DE TISSU RÉNAL DU SINGE AFRICAIN *ERYTHROCEBUS PATAS* POUR LES RECHERCHES SUR LA POLIOMYÉLITE

par V. DROUHET et L. COSTIL
[avec la collaboration technique de J. DE HERDT,
H. GOAREGUER et S. TOTTI (*)]

(Laboratoire de la Société d'Etudes et de Soins
pour les Enfants Poliomyélitiques (**).
[Président : Professeur Robert DEBRÉ])

La plupart des chercheurs utilisent pour l'étude de la poliomyélite les cultures de tissus des singes asiatiques (*Macacus rhesus*, *M. cynomolgus*) ; en Europe, ces singes sont difficiles à obtenir et leur prix de revient est élevé. De ce fait, plusieurs chercheurs ont déjà entrepris des travaux sur les cultures de tissus de nombreuses espèces de singes africains et éprouvé leur sensibilité aux virus poliomyélitiques [1, 2, 3, 4].

Dans une étude précédente [5], l'un de nous a montré que les cultures de tissu rénal du singe africain *Cercopithecus aethiops sabaeus* ont la même sensibilité aux concentrations minima des trois types de virus poliomyélitiques que les cultures de tissu rénal du singe asiatique *M. cynomolgus*.

Au cours d'une étude sur diverses espèces de singes africains, Barski, Jezierski et Lépine [2] trouvent que les cultures de fibroblastes obtenues des testicules du singe *Erythrocebus patas* sont sensibles aux virus poliomyélitiques.

Ayant la possibilité d'obtenir d'une façon régulière le singe pleureur de la savane, *Erythrocebus patas*, nous avons été amenés à étudier la sensibilité aux virus poliomyélitiques des cultures de tissu rénal de ce singe ; à cause de leur grande sensibilité à ces virus, nous les avons adoptés pour nos recherches. Dans ce travail sont exposées les méthodes employées pour l'obtention des cultures de tissu rénal d'*Erythrocebus patas*, leur utilisation pour l'isolement, l'identification et le titrage des virus poliomyélitiques et la recherche des anticorps neutralisants.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

(**) Adresse actuelle : S. E. S. E. P., Château de Longchamp, Bois de Boulogne, Paris-16°.

I. — CULTURES DE TISSU RÉNAL D'*Erythrocebus patas*.

A. — MATÉRIEL. — 1° *Singe*. Vingt singes *Erythrocebus patas* pesant entre 800 g et 5 000 g ont été utilisés au cours de cette étude.

2° *Trypsine* 1 - 300 (1) : 0,25 p. 100 de trypsine dans une solution saline tamponnée [6].

3° *Solution pour la coloration des cellules rénales* [7] : cristal violet 0,1 p. 100 dans une solution aqueuse d'acide citrique 0,1 M.

4° *Milieu de croissance* [8, 9] :

Hydrolysats enzymatique de lactalbumine (2) à 5 p. 100	100 cm ³
Solution de Hanks dix fois concentrée	100 cm ³
(contenant 0,025 g p. 100 de tétracycline (3) et 4 cm ³ de rouge phénol à 0,5 p. 100).	
Eau bidistillée stérile	750 cm ³
Sérum de veau (4)	50 cm ³
Antibiotiques :	
Pénicilline 200 000 U/cm ³	1 cm ³
Streptomycine 200 000 µg/cm ³	1 cm ³
Nystatine (5) 100 000 U/cm ³	0,25 cm ³
Solution de bicarbonate de sodium à 7,5 p. 100	7 cm ³
pH du milieu : 7,2.	

5° *Milieu d'entretien* :

Sérum ultrafiltré de bœuf (6)	15 p. 100
Solution de Hanks complète	15 p. 100
Liquide amniotique de vache (7)	70 p. 100
pH : 8,2.	

6° *Appareils* :

Flacon de trypsination de 500 cm³ (8).
Agitateur magnétique (9).

B. — MÉTHODES ET TECHNIQUES DE CULTURE DE TISSUS. — La méthode de trypsination du tissu rénal de singe préconisée par Dulbecco et Vogt [6] a été modifiée par Youngner [10]. Plus récemment, Rappaport [11] a encore amélioré la technique de trypsination en remplaçant le « waring blender » par un flacon d'Erlen-

- (1) Nutritional Biochemical Company, Cleveland, Ohio.
- (2) Nutritional Biochemical Company, Cleveland, Ohio.
- (3) Laboratoire Clin-Comar, 20, rue des Fossés-Saint-Jacques, Paris.
- (4) Laboratoires Renard, 35, rue Henri-Barbusse, Clichy.
- (5) Laboratoires Squibb, 145, avenue Malakoff, Paris.
- (6) et (7) Laboratoires Renard, 35, rue Henri-Barbusse, Clichy.
- (8) Macalaster Bicknell Co. Newhaven, Connecticut.
- (9) OHMITE, Manufacturing Company, Chicago.

meyer spécialement modifié, dans lequel les fragments de rein sont mélangés à la trypsine à l'aide d'un agitateur magnétique. Au cours de cette étude, nous avons adopté l'appareil de trypsination de Rappaport [41]. Dans la figure 1, on voit l'installation dont nous nous servons. La solution de trypsine contenue dans la

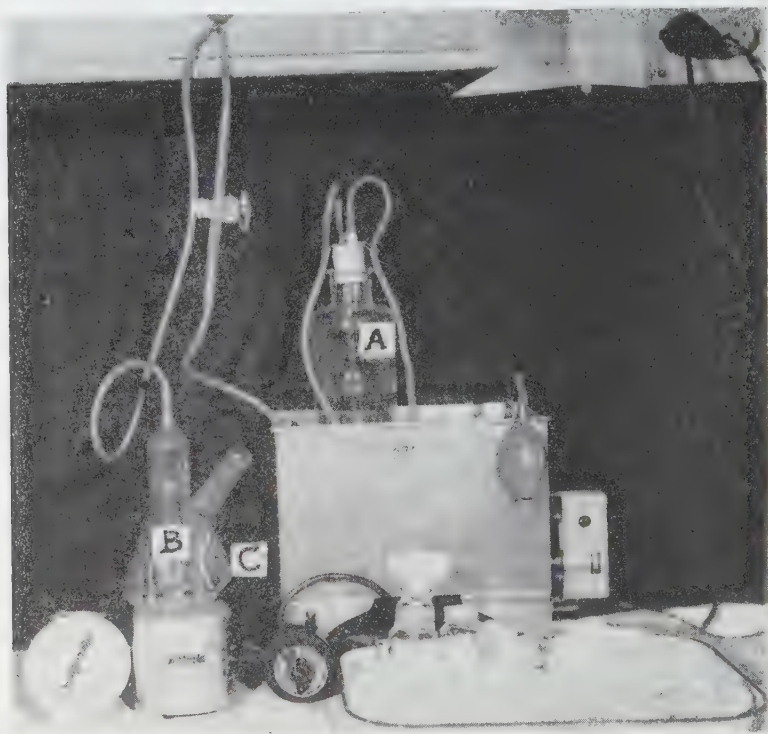


FIG. 1. — Appareillage de trypsination. A : flacon contenant la solution de trypsine dans le bain-marie à 37°. B : flacon de trypsination de C. Rappoport sur l'agitateur magnétique. C : partie renflée du flacon servant à recueillir les fragments rénaux quand on verse le liquide surnageant.

bouteille A (mise au bain-marie à 37°) est poussée à l'aide d'une poire en caoutchouc dans le flacon B. Ce flacon d'Erlenmeyer modifié contient un aimant (long de 3,7 cm et couvert de matière plastique) et repose sur un agitateur magnétique dont la vitesse est réglée par un rhéostat.

Incubation. — La zone corticale des deux reins du singe *Erythrocebus patas* est coupée en fragments de $1 \times 1 \times 1$ mm, qui

sont mis dans le flacon B et couverts de 50 cm³ de la solution de trypsine. Après une demi-heure d'incubation au bain-marie à 37°, on remue en tournant ce flacon, on l'incline du côté de son bec verseur, et, après le dépôt des fragments rénaux dans la partie renflée de cette bouteille (C), le liquide surnageant est versé à travers un entonnoir couvert de gaze dans un flacon à centrifuger conservé dans la glace.

Extraction. — Les extractions suivantes se font à la température de la chambre en ajoutant chaque fois 50 cm³ de trypsine fraîche sur les fragments de rein qui sont ensuite agités à l'aide de l'agitateur magnétique. La vitesse et la durée de l'agitation sont variées au cours de la trypsination et nous allons revenir plus bas sur les détails.

Après chaque extraction, les liquides surnageants sont recueillis dans les tubes à centrifuger ; cette opération est répétée jusqu'à ce que toutes les cellules rénales aient été séparées du tissu.

Contrôle microscopique. — Ne connaissant pas le comportement du tissu rénal d'*Erythrocebus patas* au cours de la trypsination, nous avons jugé nécessaire de contrôler chaque extraction au microscope. Un centimètre cube de chaque extraction coloré par une goutte de la solution de cristal violet est examiné, afin de se rendre compte de la richesse et de la qualité des cellules rénales.

Le but d'une bonne trypsination est d'obtenir des cellules rénales isolées ou en petits amas, dont le cytoplasme soit en bon état, donc susceptibles de se multiplier.

Au cours de la trypsination, on trouve un mélange de plusieurs éléments, dont un pourtant prédomine ; par exemple, au début, après l'incubation avec la trypsine, il y a surtout de nombreux débris cellulaires ; par la suite, les tubes urinaires (pl. hors texte, a) se détachent et se fragmentent (pl. hors texte, c) au fur et à mesure, et on arrive à obtenir des amas de cellules rénales (pl. hors texte, d) et des cellules rénales isolées (pl. hors texte, f).

Sans le contrôle microscopique, on risque, soit de détruire les cellules (pl. hors texte, e) par un contact trop prolongé avec la trypsine ou par une agitation trop poussée, soit au contraire d'obtenir des extractions pauvres en cellules rénales, ce qui augmente le temps nécessaire pour épuiser tous les fragments.

Stade de la trypsination. — Nous basant sur le contrôle microscopique des extractions, nous résumons dans le tableau I les stades d'une trypsination de 10 g de rein provenant d'un singe de 2 500 g en fonction du temps et de la vitesse d'agitation utilisés.

Pour extraire toutes les cellules rénales contenues dans les fragments rénaux, nous effectuons environ 40 extractions. Nous avons observé que les reins de jeunes singes ne se laissent pas trypsiner de la même façon que les reins de singes adultes, ce qui nous

TABLEAU I. — Stades d'une trypsinisation de 10 g de tissu rénal
(Singe n° 8 pesant 2 500 g).

Extraction n°	Durée de l'extraction (minutes)	Vitesse de l'agitation (tour/minute)	Examen Microscopique	Conduite des opérations
1-7	7'	35 t/m	Nombreux débris cellulaires, noyaux libres, tubes urinifères en petit nombre	A la fin de la 6ème extraction, le cytoplasme des cellules rénales étant trop digéré on raccourcit le temps de contact avec la trypsine
7-14	5'	35 t/m	Prédominance des tubes urinifères, amas de cellules rénales en petit nombre	Pour fragmenter les tubes urinifères, on augmente la vitesse d'agitation.
14-27	5'	50 t/m	Nombreuses cellules rénales libres ou en petits amas, à cytoplasme non altéré; quelques noyaux libres; rares tubes urinifères	Extractions très bonnes et riches. Quand les fragments rénaux se décolorent et deviennent friables on augmente la vitesse d'agitation pour les épuiser plus rapidement.
27-37	3'	75 t/m	Idem	Au moment où il ne reste que quelques fragments on agite à grande vitesse pour les dissocier
37-40	2'	100 t/m	Rares cellules rénales ou en petits amas	

fait conclure que l'adaptation d'une méthode standard de trypsinisation ne peut donner satisfaction dans tous les cas.

Centrifugation des extractions. — Quand l'extraction est terminée, les flacons contenant les différents liquides d'extraction sont centrifugés pendant cinq minutes à 500 tours/minute. La trypsine est décantée et les culots cellulaires sont réunis, lavés par centrifugation, deux fois successivement, avec le milieu de croissance. Après la dernière centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans 30 cm³ du milieu de croissance. A l'aide d'une seringue montée d'une aiguille de 2 mm de diamètre, la suspension cellulaire est aspirée et refoulée plusieurs fois avec force dans le but de l'homogénéiser.

Numération de cellules. — On prélève rapidement 0,25 cm³ de cette suspension dans un tube à hémolyse et on ajoute 0,75 cm³ d'une solution de cristal violet. Le nombre des cellules par millimètre cube est déterminé au compte-cellules de Malassez. Pour la numération des cellules, on compte chaque cellule rénale isolée dont le cytoplasme est en bon état: pour les petits amas cellulaires, on compte séparément chaque cellule dont on distingue le noyau et le cytoplasme. Les amas dont la structure n'est pas bien distincte sont considérés comme une seule cellule.

Concentration cellulaire. — La suspension cellulaire est ajustée de façon à obtenir 300 000 cellules par centimètre cube de

milieu de croissance. La suspension ainsi obtenue est agitée dans un flacon d'Erlenmeyer à l'aide de l'agitateur magnétique à petite vitesse, afin de l'homogénéiser au cours de sa distribution. A l'aide d'une pipette automatique, on répartit 1 cm³ ou 0,5 cm³ de la suspension cellulaire dans chaque tube (16/160 mm). Les tubes de culture sont incubés à 37° dans une position presque horizontale après leur bouchage. Quand, sur la paroi des tubes, on obtient une plaque uniforme de tissu épithélial, on remplace le milieu de croissance par 2 cm³ du milieu d'entretien. A partir de ce moment, les tubes sont prêts à être inoculés.

RÉSULTATS. — Notre expérience sur les cultures de tissu rénal d'*Erythrocebus patas* est établie sur un nombre de 20 singes dont le poids varie entre 850 g et 5 000 g. Dans le tableau II, nous donnons quelques exemples qui illustrent les relations existant entre le poids de l'animal, le poids de ses deux reins et le nombre de cellules obtenues par gramme de rein de ce singe.

TABLEAU II. — Rapports entre le poids du singe, le poids des reins et la quantité de suspension cellulaire obtenue.

Poids de l'animal	Poids des 2 reins	Nombre de cellules par g. de rein	Nombre de cellules par cm ³ (1 tube)	Quantité de suspension cellulaire en cc.	Croissance en jours
850 g.	4 g.	34.500.000	300.000 cell/cc.	460 cc.	4-5 j.
2.500 g.	10 g.	33.000.000	300.000 cell/cc.	1100 cc.	5-6 j.
3.000 g.	12 g.	31.000.000	300.000 cell/cc.	1240 cc.	5-6 j.
5.000 g.	20 g.	24.500.000	300.000 cell/cc.	1700 cc.	8-10 j.

Un singe de 850 g, par exemple, donne 460 cm³ de suspension cellulaire à 300 000 cellules rénales par centimètre cube. Les cultures de tissu poussent très rapidement, donnant une plaque complète de tissu après quatre à cinq jours d'incubation. Pour cette raison, dans le cas de singe jeune, nous avons réduit le nombre de cellules rénales à 200 000 cellules par centimètre cube avec de très bons résultats.

Un singe adulte d'environ 5 000 g donne 1 700 cm³ de suspension cellulaire à 300 000 cellules par centimètre cube. La croissance cellulaire pour former une plaque complète est obtenue plus

tardivement en huit à dix jours et la culture de tissu est moins bonne que celle du singe jeune.

Nous basant sur ces données, nous utilisons des singes jeunes dont le poids varie entre 2 000 et 3 000 g ; à l'heure actuelle, notre expérience établie sur plus de dix singes de cette catégorie nous a permis de standardiser les étapes de la trypsination qui sont résumées dans le tableau I.

II. — SENSIBILITÉ DES CULTURES DE TISSU RÉNAL D'« ERYTHROCEBUS PATAS » AUX CONCENTRATIONS MINIMA DE VIRUS POLIOMYÉLITIQUES.

Pour cette étude, les tubes de cultures de tissu ont été sélectionnés pour avoir la même surface de croissance épithéliale. Les souches de virus poliomyélitiques proviennent du laboratoire du Docteur A. Sabin [42] ; elles ont été spécialement sélectionnées par des passages rapides sur les cultures de tissu rénal du singe *M. cynomolgus* : souche type I, Mahoney, 34^e passage sur culture de tissu rénal ; souche type II, Y-SK, 52^e passage ; souche type III, Léon, 35^e passage sur culture de tissu.

Huit dilutions successives de virus de dix en dix sont préparées dans la solution de Hanks. 0,2 cm³ de chaque dilution est inoculé dans chacun des dix tubes de cultures de tissu. Les tubes inoculés sont incubés à 37° en position stationnaire et examinés chaque jour au microscope pendant une période de huit jours. L'effet cytopathogène décrit par Enders et coll. [13] a été observé dès le premier jour avec les trois souches types de virus poliomyélitique. Après huit jours de lecture, le titre des virus est déterminé d'après la méthode de Reed et Muench.

La dose 50 p. 100 cytopathogène pour les cultures de tissu pour 1 cm³ (DL₅₀ CT/cm³) est 10^{7,3} pour le type I Mahoney et pour le type II Y-SK, et 10^{7,7} pour le type III Léon.

Les titres de ces souches types sur les cultures de tissu rénal du singe *M. cynomolgus* étaient :

- Pour le type I Mahoney, 34^e passage sur *M. cynomolgus* : 10^{7,2} ;
- Pour le type II Y-SK, 52^e passage sur *M. cynomolgus* : 10^{7,2} ;
- Pour le type III Léon, 35^e passage sur *M. cynomolgus* : 10^{7,5}.

(La surface de croissance du tissu épithélial était à peu près identique à celle que nous avons obtenue et le calibre des tubes utilisés le même.)

Il en résulte que les cultures de tissu rénal du singe *Erythrocebus patas* sont sensibles aux trois souches types de virus poliomyélitiques et que leur sensibilité aux doses minima est très grande, comme l'indiquent les titres obtenus.

III. — ISOLEMENT DES VIRUS A PARTIR DES SELLES ET D'ÉCOUVILLONNAGES RECTAUX.

Les selles et les écouvillonnages rectaux étudiés proviennent des enfants poliomyélitiques, des sujets en contact avec ces malades ou des enfants apparemment sains.

a) *Préparation des selles.* — On émulsionne 2 g de selles dans 18 cm³ de solution de Hanks contenant les antibiotiques suivants :

Pour 1 cm³ :

Tétracycline : 0,025 g.

Nystatine : 30 U.

Pénicilline : 500 U.

Streptomycine : 500 µg.

Deux centrifugations successives à 5 000 tours/minute pendant une demi-heure sont effectuées (centrifugeuse internationale + 2°). Le pH de l'extrait de selles ainsi obtenu est rectifié avec une solution de bicarbonate de sodium à 4,4 p. 100 pour obtenir un pH (indiqué par le rouge de phénol) de 7,2.

Après cette préparation, les extraits de selles sont conservés à — 70° jusqu'au moment de l'emploi.

b) *Préparation des écouvillonnages rectaux.* — Dans les tubes stériles, on répartit 2 cm³ de solution de Hanks contenant les antibiotiques sus-cités. Après le prélèvement rectal, on plonge l'écouvillon dans le tube et on le laisse tremper une demi-heure à la température du laboratoire. Après ce délai, on exprime l'écouvillon sur les parois du tube ; le pH de l'extrait obtenu est corrigé, s'il y a lieu, avec la solution de bicarbonate de soude. Après bouchage des tubes, les extraits sont gardés à — 70° jusqu'au moment de l'emploi.

Isolement. — 0,2 cm³ d'extrait de selles ou d'écouvillonnage rectal est inoculé dans chacun des trois tubes de cultures de tissu, qui, après l'inoculation, sont incubés à 37° en position fixe légèrement horizontale.

La lecture au microscope est effectuée chaque jour pendant huit jours. L'effet cytopathogène du virus se manifeste dès le premier jour de lecture pour la plupart des isollements. Sur 145 isollements positifs, dans 17 cas le tissu avait complètement disparu au premier jour de lecture. Dans tous ces cas, le second passage sur culture de tissu s'est montré positif. Il s'agissait donc non d'un effet toxique, mais d'une très grande quantité de virus contenue dans l'extrait de selles et également d'une grande sensibilité aux virus poliomyélitiques des cultures de tissu rénal du singe *Erythrocebus palas*.

L'effet toxique des selles peut se manifester aussi dès le premier jour par une dégénérescence du tissu qui ne disparaît pas complètement. Dans les quelques cas où cette dégénérescence a été observée, la lecture de l'effet cytopathogène du virus a été cependant possible.

IV. — IDENTIFICATION DES VIRUS ISOLÉS.

Dans la technique courante d'identification des virus, il n'est pas nécessaire de faire les titrages de ceux-ci. Le liquide de culture (1^{er} passage de l'extrait de selles sur culture de tissu) est mélangé à un volume égal de chacun des antisérums poliomyélitiques (I, II, III) à la dilution 1/5 (10).

Avec cette technique, l'identification des virus isolés s'est montrée impossible à cause de l'excès de virus. Pour cette raison, on a effectué un certain nombre de titrages à partir du liquide de culture, et en calculant le titre de ces virus, on a déduit que, pour avoir 200 DL₅₀ CT il faut diluer le liquide de culture du premier passage à 1/1 000.

Technique. — 0,2 cm³ d'une dilution 1/5 de chacun des trois antisérums poliomyélitiques est mélangé à un volume égal d'une dilution de virus à 1/1 000.

Les trois mélanges sont laissés à la température du laboratoire pendant une heure. Ensuite, 0,1 cm³ de chaque mélange est inoculé dans deux tubes de culture de tissu. La dilution finale de l'antisérum est de 1/10 et la dilution du virus est de 1/2 000.

On fait la lecture au microscope tous les deux jours pendant huit jours. Les résultats du typage peuvent être déjà évidents au bout de quarante-huit à soixante-douze heures.

Nous n'avons eu l'occasion, au cours de ces isollements, de rencontrer ni associations virales avec d'autres virus se trouvant dans les selles (Coxsackie ou E.C.H.O.) ni associations de deux types de virus poliomyélitiques.

RÉSULTATS. — Parmi les 145 virus poliomyélitiques isolés, 98 appartiennent au type I, 22 au type II, 25 au type III.

Les enquêtes épidémiologiques et l'interprétation des résultats obtenus font l'objet d'une autre étude [14].

(10) Les antisérums poliomyélitiques de singe du type I, II et III nous ont été gracieusement procurés par la Fondation Américaine de Paralysie Infantile. Nous remercions vivement le Dr H. W. Kumm, Directeur de Recherches, pour son aide précieuse.

V. — RECHERCHE
DES ANTICORPS NEUTRALISANTS ANTIPOLIOMYÉLITIQUES
DANS LES SÉRUMS HUMAINS.

Les cultures de tissu obtenues en distribuant dans chaque tube seulement 0,5 cm³ d'une suspension cellulaire à 300 000 cellules par centimètre cube nous ont donné satisfaction pour les tests de neutralisation.

Chacune des trois souches types (souches du Dr Sabin) est titrée sur culture de tissu pour calculer les dilutions de virus qui contiennent 200 DL₅₀ CT. 0,4 cm³ de cette solution virale est mélangé à une quantité égale de sérum non dilué.

Dans chacun des trois mélanges, la dilution finale du virus est de 100 DL₅₀ CT et celle du sérum à tester de 1/2.

Les mélanges sérum-virus sont gardés une heure à la température du laboratoire, puis on inocule 0,2 cm³ de chacun des trois mélanges dans deux tubes de cultures de tissu.

Nous avons examiné jusqu'à présent 954 sérums d'enfants. Les enquêtes sérologiques et l'interprétation des résultats seront étudiées ailleurs.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

Les cultures du tissu rénal du singe africain *Erythrocebus patas*, dont la préparation est décrite en détail, ont été utilisées pour les recherches sur la poliomyélite.

Ces cultures présentent les avantages suivants :

1° La croissance des cellules épithéliales est rapide et de bonne qualité ;

2° Le nombre de tubes de culture obtenus d'un singe est élevé (1 000 à 1 200 tubes pour un singe de 2 000 à 3 000 g) ;

3° Elles sont sensibles aux concentrations minima des souches de virus poliomyélitiques adaptées au laboratoire ou isolées de la nature.

4° Elles peuvent être utilisées avantageusement pour les identifications des virus poliomyélitiques et pour les tests de neutralisation.

SUMMARY.

Renal tissue cultures of the African monkey *Erythrocebus patas* have been used for studies on poliomyelitis viruses. The preparation of these cultures is described in detail. They have the following advantages :

1° A good and rapid growth of epithelial cells.

2° One single monkey allows an important number of culture tubes (1 000-2 000 tubes for a monkey weighing 2 000-3 000 g).

3° The cultures are sensitive to minima concentrations of poliomyelitis virus (laboratory strains, or strains isolated from man).

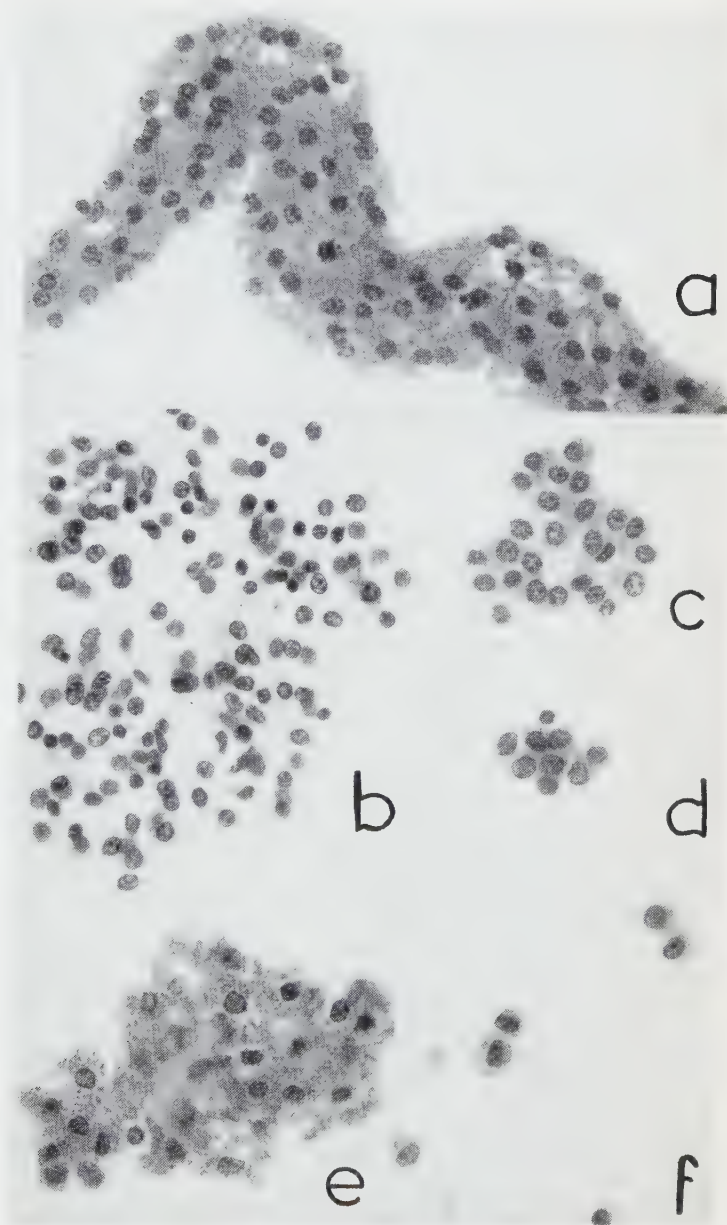
4° They can be used for identification of poliomyelitis viruses or for neutralization tests.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.), SOUZA (P. DE), MONACI (V.), ENDO (M.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 576.
- [2] BARSKI (G.), JEZERSKI (A.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 243.
- [3] JEZERSKI (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 78.
- [4] GEAR (J. H. S.). *Org. Mond. de la Santé*, Réunion sur la vaccination antipoliomyélitique, Stockholm, nov. 1955.
- [5] DROUHET (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 666.
- [6] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 167.
- [7] SANFORD (K. K.) et coll. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1951, **11**, 773.
- [8] MELNICK (J. L.) et RIORDAN (J. T.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **81**, 208.
- [9] MELNICK (J. L.) et OPTON (E.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1956, **14**, 129.
- [10] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
- [11] RAPPAPORT (C.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1956, **14**, 147.
- [12] SABIN (A. B.), HENNESSEN (W. A.) et WINSSER (J.). *J. exp. Med.*, 1954, **49**, 551.
- [13] ENDERS (J. F.), WELLER (T. H.) et ROBBINS (F. C.). *Science*, 1949, **109**, 85.
- [14] DEBRÉ (R.), CELERS (J.) et DROUHET (V.). (Sous presse.)

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Eléments cellulaires au cours de la trypsination du rein. a) Tube urinifère ; b) Glomérule rénal ; c) Fragment de tube urinifère ; d) Amas de cellules isolées en bon état ; e) Amas de cellules trop digérées ; f) Cellules rénales isolées (Coloration au cristal violet 0,1 p. 100 ; grossissement : $\times 370$).





LA GALACTOSIDE-PERMÉASE D'*ESCHERICHIA COLI* (*)

par HOWARD V. RICKENBERG, GEORGES N. COHEN, GÉRARD BUTTIN
et JACQUES MONOD.

[Institut Pasteur. Service de Biochimie Cellulaire (**)]

INTRODUCTION.

Nous décrivons, dans ce mémoire, un système caractérisé par la propriété d'accumuler, dans les cellules d'*Escherichia coli*, les galactosides exogènes. La découverte de ce système inductible, distinct de la β -galactosidase, mais qui commande *in vivo* l'activité de cet enzyme ainsi que son induction, donne une solution à de nombreux problèmes que posaient le métabolisme des galactosides et l'induction de la β -galactosidase chez *E. coli*, et apporte une confirmation expérimentale à l'hypothèse, souvent envisagée, que des systèmes catalytiques stériquement spécifiques et fonctionnellement spécialisés, distincts des enzymes métaboliques proprement dits, gouvernent la pénétration de certains substrats dans les cellules microbiennes.

La validité très générale de cette hypothèse a été confirmée en outre par la découverte de systèmes qui assurent la pénétration et l'accumulation de divers aminoacides chez *E. coli*, systèmes comparables à celui-ci par leurs propriétés cinétiques et leur degré de spécificité [5, 6]. Certains des résultats exposés dans le présent mémoire ont été résumés dans une note préliminaire [4]. Le rôle, dans l'induction de la galactosidase, du système qui concentre les galactosides est envisagé dans d'autres publications [34, 8].

PRODUITS, SOUCHES ET TECHNIQUES.

PRODUITS. — Le méthyl- β -D-thiogalactoside (TMG) radioactif a été synthétisé au laboratoire (à partir de tétra-acétylbromogalactose et de méthyl-mercaptan marqué au ^{35}S) selon la technique mise au point par M. D. Turk [47], dans le laboratoire de M. Helferich, à Bonn. L'activité spécifique initiale était de 5 mc/mM. Les autres thiogalactosides

(*) Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation Rockefeller de New-York, du « Jane Coffin Child's Memorial Fund » et du Commissariat à l'Energie Atomique.

(**) Manuscrit reçu le 6 juillet 1956.

ont été également synthétisés par M. D. Turk [47]. Les autres produits étaient commerciaux. Le maltose du commerce était recristallisé deux fois dans l'alcool à 80°.

SOUCHES. — Nous avons utilisé diverses souches normales et mutantes d'*E. coli* ML et K 12. Les mutants de ML avaient été isolés au laboratoire [35, 37, 7], tandis que la plupart des mutants de K 12 nous avaient été envoyés par M. J. Lederberg, de Madison (U.S.A.). Lorsque, dans les expériences qui suivent, la souche n'est pas spécifiée, il s'agit d'*E. coli* ML 30 (type normal).

MILIEUX ET CONDITIONS DE CROISSANCE. — On employait le milieu synthétique 56 [36] sans Cl_2Ca avec du succinate (4 mg/ml) ou du maltose (2 mg/ml) comme aliment carboné. Les cultures étaient agitées en fioles coniques à 34° C. Pour les expériences, on employait des cultures en voie de croissance exponentielle, centrifugées et remises en suspension dans le milieu voulu, à la densité voulue. La densité des cultures était déterminée par lecture de la densité optique à 600 μm ; elle est exprimée en μg de poids sec bactérien par millilitre.

Mesure de l'activité β -galactosidasique des suspensions. — Les suspensions étaient additionnées de toluène et agitées quinze minutes à 34° C. La mesure d'activité était effectuée en présence d'ONPG M/350, d'ions Na^+ M/10 à pH 7 et à 28° C. L'unité de β -galactosidase est la quantité d'enzyme qui, dans ces conditions, libère 1 μmM d'o-nitrophénol en une minute [36]. La libération de l'o-nitrophénol était déterminée par mesure de l'accroissement de densité optique à 4200 Å, dans un spectrophotomètre Beckman.

Hydrolyse de l'ONPG in vivo. — La vitesse d'hydrolyse *in vivo* était déterminée en milieu 56, en présence de succinate (2 p. 1 000), d'ONPG M/400, en fioles agitées à 34° C. La réaction était arrêtée par addition de CO_3Na_2 M/2 [26].

Mesure de l'accumulation du TMG. — La technique généralement adoptée (sauf exception spécifiée) était la suivante :

Les suspensions, ajustées à une concentration de l'ordre de 150-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ étaient agitées à 34° C en milieu 56, en présence de maltose (2 p. 1 000) ou de succinate (2 p. 1 000), de chloromycétine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de TMG (5.10⁻⁴M). [Le produit radioactif était mélangé en proportion voulue de TMG non radioactif, de façon à obtenir 20 000 impulsions/mm environ par μM , avec le compteur utilisé.] Après dix minutes d'incubation, un échantillon (5 cm^3) était prélevé, refroidi à 0° C, puis centrifugé à 15 000 g pendant cinq minutes. Le liquide surnageant était aspiré à l'aide d'une pipette reliée à une trompe, et les parois des tubes étaient séchées très soigneusement, à l'aide de papier filtre, jusqu'au voisinage immédiat du culot. Le culot était alors repris dans 1,5 cm^3 d' H_2O , porté à 100° C pendant cinq minutes et recentrifugé. On décantait le liquide surnageant dont on déterminait la radioactivité.

Mesure de la radioactivité. — On utilisait un compteur G-M relié à une échelle de 100, dans lequel on passait des échantillons d'épaisseur infinitésimale. Pour chaque détermination, on comptait

1 000 impulsions dans deux échantillons. Compte tenu des erreurs volumétriques, l'indétermination est de l'ordre de ± 5 p. 100.

EXPÉRIENCES.

Accumulation du TMG par les bactéries induites. — Lorsque des bactéries induites (c'est-à-dire des bactéries qui se sont développées en présence d'un galactoside inducteur) sont incubées pendant cinq minutes en présence de méthyl- β -D-thiogalactoside (TMG) radioactif, puis centrifugées, on constate qu'elles entraînent une quantité de radioactivité beaucoup plus forte que des bactéries non induites traitées de la même façon. En présence d'azoture de sodium ou de 2,4-DNP, l'accumulation de TMG par les bactéries induites est inhibée de plus de 95 p. 100 (tableau I).

TABLEAU I. — Accumulation du thiométhyl- β -D-galactoside par des bactéries induites et non induites.

Bactéries (*)	Impulsions/an pour 100 μ g de bactéries		TMG accumulé en	
	observées	corrigées (**)	% du poids sec des bactéries	valeurs relatives
Non induites	17	2	0,0	0
d° + NaN ₃ (2.10 ⁻² M)	15	0	0,0	0
Induites	422	407	2,7	100
d° + NaN ₃ (2.10 ⁻² M)	35	20	0,13	5
d° + 2,4-dinitrophénol (10 ⁻³ M)	39	24	0,16	6
d° + phényl- β -D-thiogalactoside (10 ⁻³ M)	56	41	0,27	10
d° + phényl- β -D-thiogluco-side (10 ⁻³ M)	415	400	2,6	96

(*) L'expérience est faite dans les conditions données page 830, en présence de TMG 5.10⁻⁴M. et de chloramphénicol à 50 μ g/ml ; souche ML30.

(**) Les valeurs « observées » sont corrigées de 15 impulsions/mn en moins, correspondant à la radioactivité entraînée par les bactéries non induites (voir texte, page.....).

La présence d'un substrat carboné métabolisable accroît l'accumulation de TMG dans des proportions variables (10 à 100 p. 100) selon que les bactéries ont été, au préalable, carencées plus ou moins longtemps en aliment carboné.

En admettant, pour les bactéries, une densité de 1 et une hydratation de 75 p. 100, on voit que la concentration intracellulaire du TMG chez les bactéries induites est de l'ordre de soixantedix fois sa concentration dans le milieu extérieur. Dans d'autres expériences, le facteur de concentration dépassait 100. Il existe donc, chez ces bactéries, un mécanisme capable de prélever le

TMG dans le milieu extérieur et de l'accumuler dans les cellules. L'inhibition de ce mécanisme par l'azoture, le DNP, et la carence en substrat carboné, indique que l'accumulation de TMG est couplée à des réactions donatrices d'énergie métabolique.

Ce mécanisme ne fonctionne pas chez les bactéries non induites, puisque les faibles quantités de radioactivité qu'elles entraînent ne sont pas diminuées en présence d'azoture. Il s'agit donc, dans ce cas, d'un entraînement *passif* correspondant sans doute prin-

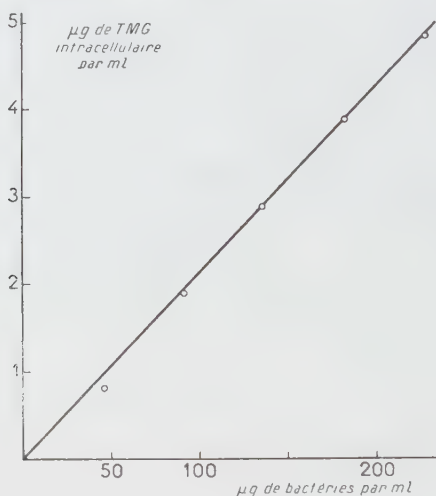


FIG. 1. — Accumulation intracellulaire du TMG par unité de volume de culture en fonction de la masse bactérienne en suspension. — Expérience d'accumulation effectuée dans les conditions données page 830 avec différentes dilutions d'une même suspension bactérienne. La masse bactérienne par unité de volume est exprimée ici en microgrammes de poids sec par millilitre.

ciplement au TMG contenu dans la pellicule liquide résiduelle adhérente au verre et aux bactéries elles-mêmes. Pour le calcul de l'accumulation de TMG, l'entraînement passif doit être soustrait. Sur la base d'une série d'essais effectués avec des bactéries non induites en présence de NaN_3 , nous avons adopté une correction uniforme de $1 \mu\text{l}$ supposé « passivement entraîné » pour un culot de $100 \mu\text{g}$ de poids sec.

La figure 1 montre que, compte tenu de cette correction, la quantité de TMG accumulée par les bactéries par unité de volume est proportionnelle à la concentration bactérienne, à la condition cependant que la concentration du TMG dans le milieu extérieur demeure pratiquement constante.

La radioactivité accumulée par les bactéries est entièrement extraite par l'eau bouillante. Le TMG n'est pas hydrolysé par la β -galactosidase et n'est pas métabolisé par les bactéries, en ce sens qu'il n'est pas utilisé comme source de carbone, ni comme source de soufre. La radioactivité extraite de bactéries incubées à 34° C, de dix minutes à une heure, en l'absence d'une source d'énergie exogène en présence de TMG radioactif, est toujours associée à une substance unique, ayant les propriétés chromatographiques du TMG. Toutefois, lorsque l'incubation a lieu en présence d'une source d'énergie exogène, une substance radioactive, présentant un Rf plus élevé que le TMG dans le solvant employé (butanol 4, acide acétique 1, eau 1), s'accumule lentement dans les bactéries et dans le milieu. La nature de cette substance et de sa réaction formatrice feront l'objet d'un travail distinct [20]. Il suffira de souligner ici que si cette réaction est sans doute conditionnée par l'accumulation intracellulaire du TMG, en revanche l'accumulation peut avoir lieu sans qu'il se forme de traces décelables de cette substance [20]. Dans tout ce qui suit, nous considérerons des expériences effectuées dans des temps assez courts et avec des concentrations bactériennes assez faibles, pour que la fraction de TMG convertie soit négligeable (moins de 5 p. 100).

Réversibilité, équilibre, saturation. — Le TMG radioactif accumulé au préalable par les bactéries peut être déplacé par addition de TMG non radioactif ou relâché à la suite de l'addition d'azo-

TABLEAU II. — Inhibition et réversion par le 2,4-dinitrophénol et l'azoture de sodium de l'accumulation intracellulaire du TMG.

Conditions (*)	Impulsions $\times \text{mn}^{-1}$ pour 100 μg de bactéries (**)	TMG accumulé en	
		% du poids sec des bactéries	valeurs relatives
TMG à 0 mn Echantillon pris à 5 mn	343	2,5	100
TMG à 0 mn Echantillon pris à 10 mn	345	2,5	100
TMG + NaN_3 à 0 mn Echantillon pris à 5 mn	27	0,20	8
TMG à 0 mn, NaN_3 à 5 mn Echantillon pris à 10 mn	13	0,16	6
TMG + 2,4-DNP à 0 mn Echantillon pris à 5 mn	31	0,22	9
TMG à 0 mn, 2,4-DNP à 5 mn Echantillon pris à 10 mn	55	0,39	16

(*) Expérience effectuée selon la technique donnée page 830. TMG radioactif 5.10—4M ; 2,4-dinitrophénol (DNP) 10—3M ; NaN_3 0,02 M.

(**) Déduction faite de l'entraînement passif (Cf. page 832).

ture ou de 2,4-dinitrophénol (tableau II). L'accumulation est donc réversible, ainsi que le montre également le fait qu'un équilibre

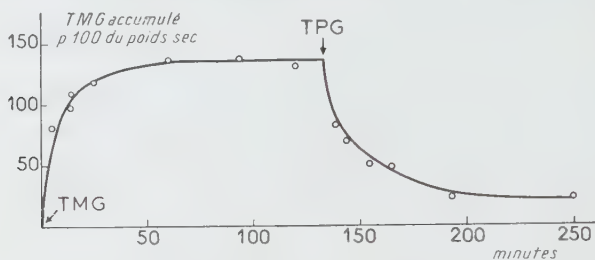


FIG. 2. — Accumulation du TMG par une suspension bactérienne à 0° C. — Conditions : TMG radioactif 5.10^{-4} M ajouté à temps 0. Thiophényl- β -D-galactoside (TPG) non radioactif ajouté au moment indiqué par la flèche. On voit que, à cette température, l'équilibre d'accumulation est réalisé en cinquante minutes environ. L'addition du TPG provoque un déplacement du TMG accumulé.

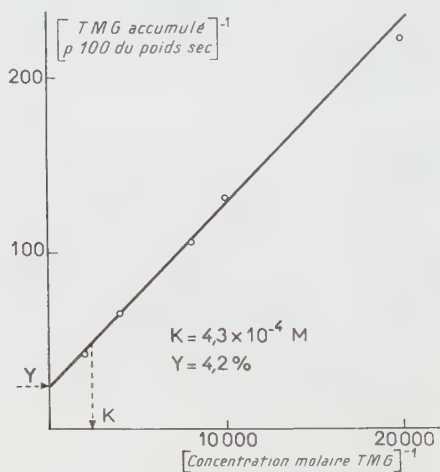


FIG. 3. — Variation de la quantité de TMG accumulé en fonction de la concentration externe du TMG (coordonnées inverses). — La linéarité de la relation montre que le TMG accumulé à l'équilibre varie en fonction de la concentration externe du TMG, conformément à une isotherme d'adsorption. K et Y correspondent à la valeur déterminée graphiquement des constantes de l'équation (1) [Voir texte, p. 835].

s'établit entre la concentration externe et la concentration interne de TMG. Cet état d'équilibre est atteint en moins de cinq minutes à 34° C. Le même équilibre est atteint à 0° C, mais beaucoup

plus lentement (fig. 2). La concentration interne à l'équilibre varie en fonction de la concentration externe, conformément à une isotherme d'adsorption, aux erreurs près des déterminations

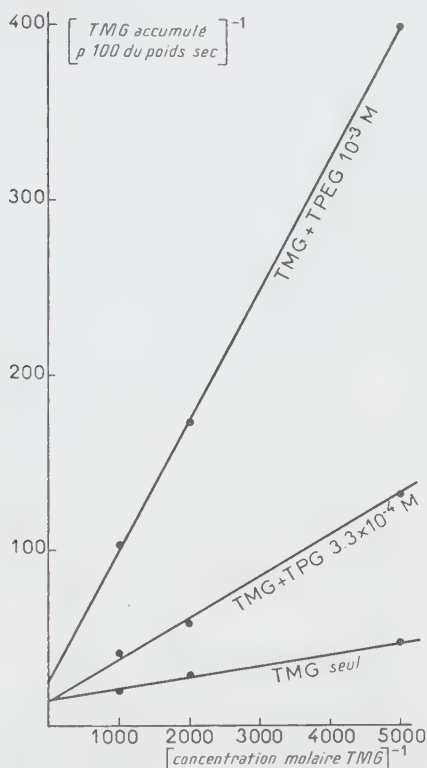
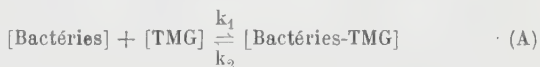


FIG. 4. — Inhibition de l'accumulation du TMG par le thiophényl- β -D-galactoside (TPG) ou le thiophényl-éthyl- β -D-galactoside (TPEG) [coordonnées inverses].

(fig. 3). Tout se passe, en définitive, comme si l'on avait un équilibre global :



En appelant G_{ex} la concentration externe du TMG et $\text{eq}G_{\text{in}}$ la quantité intracellulaire de TMG à l'équilibre, on peut écrire :

$$\text{eq}G_{\text{in}} = Y \frac{G_{\text{ex}}}{G_{\text{ex}} + K} \quad (1)$$

K étant la constante de dissociation du « complexe » bactéries-

TMG et Y une constante que nous appellerons la « capacité ». La « capacité spécifique » du système sera la capacité totale ramenée à un poids donné (100 μ g) de bactéries. Pour l'instant, cette équation doit être considérée comme ne donnant qu'une description empirique (encore que fort exacte) du phénomène.

Les capacités ne peuvent, en général, pas être déterminées pour des concentrations saturantes de TMG, qui permettraient d'éliminer des variations éventuelles de la constante K car, à de telles concentrations, l'erreur sur l'estimation de la contamination passive deviendrait trop importante. La mesure du TMG intracellulaire, toujours effectuée à une concentration non saturante de TMG externe (en général $5 \cdot 10^{-4}$ M), reflétera des variations éventuelles de la constante K aussi bien que de la capacité Y. Il importe donc de noter ici que la valeur de la constante de dissociation K, de l'ordre de $4 \cdot 10^{-4}$ M, ne semble pas varier notablement, même d'une souche à une autre, compte tenu du peu de précision de sa détermination (± 20 p. 100), pourvu que les bactéries utilisées soient en bon état physiologique.

Compétition, spécificité stérique. — L'accumulation du TMG radioactif est inhibée par le phényl- β -D-thiogalactoside. Elle n'est pas inhibée par son homologue glucosidique, le phényl- β -D-thioglucoside, qui n'en diffère que par sa configuration autour du carbone 4 (tableau III). De façon générale, les glucides possédant un radical galactosidique non substitué, en liaison α ou β , inhibent compétitivement (Cf. fig. 4) le système, alors que les glucides

TABLEAU III. — Effet inhibiteur de divers glucides sur l'accumulation du TMG.

Suspension de bactéries induites incubées 10 mn en présence de TMG $2 \cdot 10^{-4}$ M	TMG accumulé en % du poids sec bactérien	Inhibition %
Sans addition	2,5	-
+ Mannosé $2 \cdot 10^{-3}$ M	2,5	0
+ Sucrose $2 \cdot 10^{-3}$ M	2,6	0
+ Cellobiose $2 \cdot 10^{-3}$ M	2,4	4
+ Mélibiose $2 \cdot 10^{-3}$ M	0,06	97
+ Lactose $2 \cdot 10^{-3}$ M	-	95 (*)
+ Phényl- β -D-thioglucoside $2 \cdot 10^{-3}$ M	-	0 (*)
+ Phényl- β -D-thiogalactoside $2 \cdot 10^{-3}$ M	-	95 (*)

(*) Seules les valeurs relatives sont données ici, ces résultats ayant été obtenus dans d'autres séries d'expériences avec des suspensions bactériennes différentes.

ne possédant pas de radical galactosidique sont sans effet notable, ou n'exercent qu'une faible action non compétitive (tableau III). L'addition du compétiteur *après* le TMG se traduit par un déplacement du TMG accumulé (voir fig. 2). Le système qui concentre le TMG présente donc une spécificité stérique très étroite, comparable à celle d'un enzyme.

Les galactosides compétiteurs du TMG sont eux-mêmes accumulés par les cellules induites, comme nous avons pu le constater

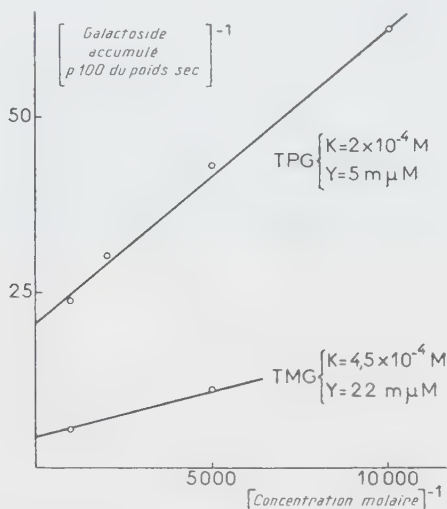


FIG. 5. — Accumulation comparée du TMG et du thiophényl- β -D-galactoside (TPG) par une même suspension bactérienne (coordonnées inverses). — L'accumulation des deux galactosides est déterminée indépendamment (on utilise du TPG radioactif marqué au soufre 35) sur plusieurs échantillons d'une même suspension bactérienne. K et Y sont les constantes de l'équation (1) déterminées dans cette expérience pour chacun des deux galactosides.

pour le thiophényl- β -D-galactoside (TPG) [fig. 5], ainsi que pour l'*o*-nitro-phénol- β -D-galactoside. La mesure de l'effet compétitif (déplacement du TMG) [Cf. fig. 4] permet d'évaluer la constante K de l'équation (1) pour des galactosides autres que le TMG (tableau IV). Dans le cas du TPG, les constantes K et Y ont pu être évaluées directement (fig. 5). On remarquera que pour une même suspension bactérienne, la capacité Y pour le TPG est plus faible que pour le TMG, alors que l'affinité ($1/K$) est plus forte pour le TPG que pour le TMG.

Induction. — La capacité spécifique du système, nulle chez les bactéries non induites, commence à augmenter immédiatement

TABLEAU IV. — Affinités spécifiques relatives de divers thiogalactosides pour la galactoside-perméase (γ) et la β -galactosidase (z) (1).

Composé :	Constante de dissociation (conc. molaire $\times 10^{-4}$)		Affinités relatives (TMG = 1)	
	γ	z	γ	z
Méthyl- β -D-thiogalactoside	4	120	1	1
Phényl- β -D-thiogalactoside	2	10	2	12
Phényl-éthyl- β -D-thiogalactoside	2	0,15	2	800
Galactosido- β -D-thiogalactoside	0,16	160	25	0,8

(*) En ce qui concerne la galactoside-perméase, les constantes de dissociation ont été déterminées : pour le TMG directement, par mesure de l'accumulation à diverses concentrations externes (Cf. page 830) ; pour les autres galactosides, par déplacement compétitif du TMG (Cf., page 835 et fig. 4).

Pour la β -galactosidase, les constantes de dissociation ont été déterminées d'après l'inhibition compétitive de l'hydrolyse de l'orthonitrophényl- β -D-galactoside. On employait un extrait enzymatique partiellement purifié, en milieu 56, pH 7,0.

L'approximation des déterminations des constantes de dissociation est de l'ordre de ± 20 p. 100.

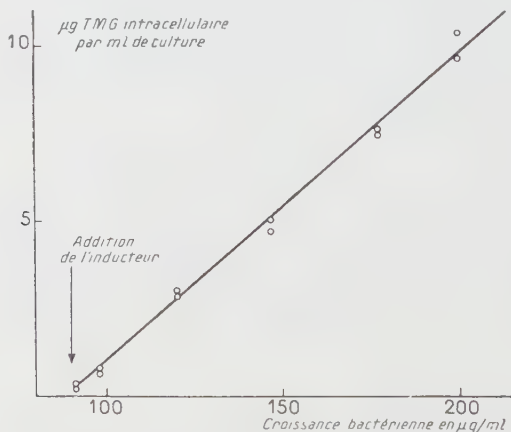


FIG. 6. — *Accroissement de la capacité d'accumulation à l'égard du TMG dans une culture en voie de croissance en présence de TMG.* — Culture en voie de croissance exponentielle sur milieu synthétique au succinate. Au point indiqué par la flèche, addition de TMG non radioactif 5.10^{-4} M. Croissance suivie par mesure de densité optique, exprimée ici en ordonnées comme un accroissement de masse par millilitre. A intervalles appropriés, prélèvement d'un échantillon, centrifugation, lavage, resuspension en présence de TMG radioactif (10^{-3} M) et de chloromycétine. Détermination de la capacité d'accumulation selon la technique habituelle (p. 830). En ordonnées, on a porté la capacité d'accumulation par millilitre de culture (noter que, dans les autres graphiques, c'est la capacité spécifique qui intervient).

après l'addition de TMG dans une culture en voie de croissance et s'accroît ensuite pendant plusieurs générations cellulaires (fig. 6). Au cours de cet accroissement, la valeur de la constante de dissociation (K) de l'équation (1) ne varie pas notablement, ainsi que le montre la figure 7. Le phénomène d'induction se traduit donc essentiellement par un accroissement de la *capacité spécifique* Y .

L'induction du système est bloquée par la chloromycétine, dont on sait qu'elle inhibe la synthèse des protéines sans inhiber la

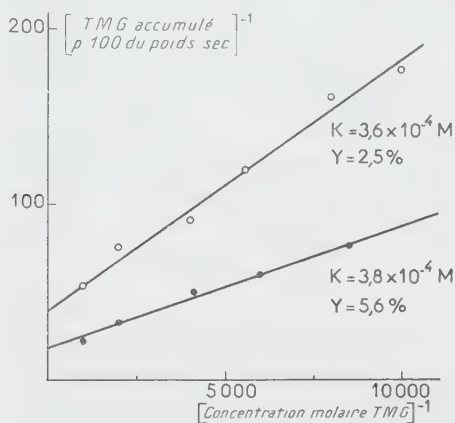


FIG. 7. — Variation des constantes K et Y de l'équation d'accumulation au cours de l'induction d'une culture. — Une culture en phase de croissance exponentielle en milieu synthétique-succinate, est additionnée de TMG (2.10^{-4} M). Des échantillons sont prélevés après vingt minutes et une heure environ de croissance en présence de TMG. Les bactéries sont centrifugées et lavées. L'accumulation du TMG est déterminée à plusieurs concentrations de TMG externe dans chacun des deux échantillons. On constate que, alors que la capacité (Y) a augmenté de plus du double entre le premier et le second prélèvement, la valeur de la constante K n'a pas varié de façon significative.

synthèse des acides nucléiques ni le métabolisme énergétique. La formation du système est également inhibée par divers analogues stériques d'acides aminés, tels que la thiénylalanine dont on sait que, sans bloquer la synthèse des protéines [41], ils inhibent la formation de certaines protéines actives, en particulier la synthèse de la β -galactosidase. Enfin, la formation induite du système n'a pas lieu en l'absence de méthionine exogène chez un mutant d'*E. coli* qui n'en fait pas la synthèse (tableau V).

La formation du système est donc liée à la synthèse des protéines. Lorsque la concentration inductrice de TMG est suffisante (5.10^{-4} M ou plus), la capacité totale s'accroît *linéairement* en

TABLEAU V. — Inhibition de la formation induite de la galactoside-perméase par la chloromycétine, la β -2-thiénnylalanine et par la carence en méthionine, chez un mutant d'*E. coli* auxotrophe pour la méthionine.

<i>E. coli</i> (K12 M ⁻), suspension lavée, en milieu 56 à 2 p. 1000 de maltose, incubée pendant une heure à 34°C avec les additions suivantes :	TMG accumulé en % du poids sec
a) - Méthionine 10^{-4} M - TMG 10^{-3} M	1,8
b) - Sans méthionine - TMG 10^{-3} M	0,1
c) - Méthionine 10^{-4} M - Chloromycétine 50 γ /cm ³ - TMG 10^{-3} M	0,0
d) - Méthionine 10^{-4} M - β -2-thiénnylalanine 10^{-4} M - TMG 10^{-3} M	0,0

fonction de l'accroissement de la masse bactérienne, pendant au moins une ou deux divisions, à partir du moment de l'addition de l'inducteur. On peut donc écrire :

$$\Delta Y = p \Delta x$$

x étant la masse bactérienne totale et p une constante dépendant de la souche et des conditions d'induction. Cette relation, identique à celle qui a été trouvée pour la synthèse induite de la galactosidase [40], signifie que l'accroissement de la capacité est lié à la synthèse de substance cellulaire *nouvelle*, c'est-à-dire dont les éléments sont incorporés après l'addition de l'inducteur [40, 38, 22].

L'analogie et le lien étroit entre l'induction de ce système et l'induction de la β -galactosidase apparaissent avec évidence lorsqu'on compare le pouvoir inducteur de divers thiogalactosides, pour la galactosidase d'une part, pour le système de concentration du TMG d'autre part (tableau VI). A quelques différences près, dont la signification est peut-être douteuse, l'activité inductrice relative des divers composés est la même pour les deux systèmes : les alkyl-thiogalactosides sont de bons inducteurs, tandis que les aryl-thiogalactosides n'induisent que faiblement, ou pas du tout. Le galactosido- β -D-thiogalactoside est également inactif. On notera en particulier avec intérêt que le phényl-éthyl-thiogalactoside, dont l'aglycone est à la fois aromatique et aliphatique, présente une activité inductrice faible, mais significative, pour la β -galactosidase comme pour le système de concentration.

Ajoutons que la synthèse induite du système est totalement inhibée en présence de glucose (10^{-3} M). On sait que cet effet inhibiteur du glucose se rencontre dans l'induction d'un très grand nombre d'enzymes, dont la β -galactosidase [33, 17, 8, 9].

TABLEAU VI. — Induction de la galactoside-perméase et de la β -galactoside par divers thiogalactosides (*).

Inducteur ajouté pendant la croissance :	(Y) TMG accumulé en % du poids sec	(g) Activité de la β -galactosidase par mg de poids sec bactérien
Sans inducteur	< 0,05	2
Méthyl- β -D-thiogalactoside	3,7	8.500
Propyl- β -D-thiogalactoside	3,8	8.800
Isopropyl- β -D-thiogalactoside	2,6	9.500
Hexyl- β -D-thiogalactoside	0,3	8,5
Phényl- β -D-thiogalactoside	0,1	2
Benzyl- β -D-thiogalactoside	0,2	16
Phényl-éthyl- β -D-thiogalactoside	1,2	110
Galactosido- β -D-thiogalactoside	0,2	4

(*) Cultures en milieu synthétique à 2 p. 1 000 de succinate, en présence d'inducteur M.10—3. Accumulation mesurée en présence de TMG 10—3M.

Schéma cinétique et nature du système. — Voyons maintenant comment on peut comprendre le fonctionnement du système. Sa spécificité étroite impose une première conclusion : comme les galactosides seuls peuvent chasser le TMG et saturer le système, il faut que celui-ci comporte des accepteurs stériquement spécifiques, formant avec les galactosides un complexe réversible. La capacité Y dépend du nombre (ou de l'activité) de ces accepteurs. Comme la valeur d'Y augmente au cours de l'induction, il faut que celle-ci se traduise par un accroissement du nombre ou de l'activité des accepteurs. Comme cet accroissement est induit dans les mêmes conditions que la synthèse de la galactosidase, comme il est proportionnel à la synthèse de protéine nouvelle et qu'il est bloqué par les inhibiteurs de la synthèse protéinique, il est plus que vraisemblable que la formation induite du système consiste dans la synthèse d'une protéine « acceptrice » spécifique.

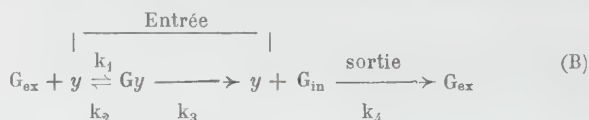
Ceci posé, il reste à considérer le rôle de la protéine acceptrice (que nous désignerons par le symbole « y ») dans le phénomène d'accumulation. L'hypothèse la plus simple serait que ce rôle fût celui d'un *récepteur stoechiométrique*, le TMG « interne » étant supposé adsorbé sur ces accepteurs spécifiques. Ce modèle expliquerait les principales propriétés du système (saturation, équilibre, spécificité, réversibilité), mais il ne peut être retenu pour les raisons suivantes :

1° Chez les bactéries pleinement induites, la saturation en TMG

correspond à plus de 5 p. 100 du poids sec des bactéries. Si l'on supposait que le TMG est adsorbé sur des accepteurs spécifiques protéiniques, cela ferait, en moyenne, un accepteur pour chaque fraction de protéine bactérienne de P. M. 2 000. Conclusion évidemment absurde.

2° Selon le modèle stoechiométrique, la capacité exprimée en moles de galactoside adsorbé par unité de masse bactérienne devrait, pour une suspension donnée, être la même pour différents galactosides. Cela est loin d'être le cas pour le TMG et le TPG (fig. 7) ; quoique le TPG puisse déplacer entièrement le TMG, les cellules concentrent à saturation cinq fois moins de TPG que de TMG.

L'hypothèse stoechiométrique n'est donc pas vraisemblable et il faut admettre que la protéine « acceptrice » joue un rôle *catalytique* dans la réaction (A). Pour expliquer les propriétés du système, en particulier la saturation et le déplacement compétitif, on est alors conduit au schéma suivant (modèle catalytique) :



selon lequel les accepteurs y jouent le rôle d'un enzyme catalysant la réaction d'entrée, tandis que la sortie a lieu par un processus indépendant, c'est-à-dire n'intéressant pas les accepteurs.

En admettant, pour la réaction d'entrée, une cinétique de Henri-Michaelis, et pour la réaction de sortie une vitesse proportionnelle à la quantité G_{in} de TMG intracellulaire, on peut écrire :

$$\frac{d G_{\text{in}}}{dt} = k_3 y \frac{G_{\text{ex}}}{G_{\text{ex}} \times k_2/k_1} - k_4 G_{\text{in}}$$

En posant :

$$\frac{k_3}{k_4} y = Y \text{ et } \frac{k_2}{k_1} = K$$

on a, pour l'état d'équilibre, l'équation (1) qui exprime, comme nous l'avons vu, les propriétés expérimentales du système.

Ce modèle implique évidemment que la pénétration ou la sortie passive du TMG soit extrêmement lente par rapport à la vitesse de la réaction catalysée par y , sans quoi il ne pourrait y avoir d'accumulation. On doit donc penser que la protéine y est associée, de quelque façon, avec la membrane cellulaire, ou du moins avec la barrière osmotique qui sépare fonctionnellement l'extérieur et l'intérieur de la cellule.

On verra sans peine que le modèle proposé rend compte, non seulement de l'équilibre, mais du déplacement du TMG radio-actif par des analogues ou par des inhibiteurs métaboliques : ce déplacement résulte de l'inhibition de la réaction d'entrée, sans inhibition de la réaction de sortie. Le modèle explique que, pour une même suspension, les capacités ne soient pas les mêmes pour différents galactosides puisque les constantes de vitesses k_3 et k_4 seront différentes, en valeurs absolues et relatives, pour différentes substances. Il prévoit enfin que le nombre de molécules de TMG intracellulaire, à l'équilibre, sera proportionnel, *mais non égal*, au nombre des accepteurs spécifiques.

Dans la mesure où les constantes de vitesse k_3 et k_4 des réactions d'entrée et de sortie demeurent invariables, la détermination de la capacité Y constitue une mesure de la quantité de la protéine acceptrice. La relation linéaire trouvée entre l'accroissement du TMG intracellulaire et l'accroissement de masse bactérienne en présence d'inducteur (p. 840) montre que cette hypothèse est valable entre d'assez larges limites. Il importe cependant de garder présent à l'esprit le fait que la quantité de TMG accumulée à l'équilibre résulte non seulement de la vitesse de la réaction d'entrée catalysée par le système y , mais aussi de la vitesse de la réaction de sortie. Le plus vraisemblable semble être que la vitesse de cette dernière réaction exprime la perméabilité *passive* de la barrière osmotique cellulaire, perméabilité qui pourrait varier sous l'influence de certains facteurs physiologiques. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des résultats indique que, dans les conditions de nos expériences, la constante de vitesse de cette réaction, pour une substance donnée, ne varie pas notablement.

Il est vraisemblable que la réaction d'entrée met en jeu, outre la protéine acceptrice y , d'autres constituants (coenzymes, transporteurs) responsables en particulier du couplage du système avec des réactions donatrices d'énergie libre. Les données que nous possédons actuellement, si elles mettent en lumière l'existence, le rôle catalytique et les propriétés spécifiques de la protéine, ne permettent pas de discuter utilement le mécanisme de la réaction catalysée.

En conclusion, nous attribuons l'accumulation réversible des galactosides, chez les bactéries induites, à l'imperméabilité des cellules, compensée par l'activité d'un système catalytique de nature protéinique, possédant les propriétés cinétiques, la spécificité et l'inductibilité d'un enzyme.

Pour marquer à la fois l'originalité fonctionnelle de ce système et son analogie avec un système enzymatique proprement dit, nous proposons de désigner son constituant spécifique (y) sous le nom de *galactoside-perméase*. Dans la seconde partie de ce travail, nous allons considérer les rapports fonctionnels et génétiques entre

la galactoside-perméase et la β -galactosidase. Nous verrons que ces données confirment pleinement l'interprétation que nous avons adoptée en démontrant à la fois l'indépendance de la perméase par rapport à la β -galactosidase et l'association fonctionnelle des deux systèmes.

Relations fonctionnelles entre la galactoside-perméase et la β -galactosidase. — Les conclusions que nous venons de résumer suggèrent que le métabolisme *in vivo* d'un galactoside chez *E. coli* comporte normalement l'intervention de la perméase (y) avant l'hydrolyse du substrat par la β -galactosidase (z). On aurait la séquence suivante :



Ce schéma suppose :

- a) Que la perméase et l'hydrolase sont des systèmes distincts ;
- b) Que la galactosidase est « interne » par rapport à la perméase.

On sait que divers mutants caractérisés par l'incapacité de métaboliser le lactose ont été isolés chez *E. coli* (souches K12 et ML) [28, 37, 7]. Si le schéma ci-dessus et les suppositions qu'il implique sont exacts, il devrait en principe exister, parmi ces mutants, au moins deux types biochimiques différents, l'un correspondant à la perte de la perméase, l'autre à la perte de la β -galactosidase. L'étude d'une série de mutants lactose-négatifs montre qu'effectivement les deux types prévus existent (tableau VII), ainsi que quelques autres sur lesquels nous reviendrons tout à l'heure.

Comme on le voit, certains mutants (« négatifs absolus », K12W2244 et K12W2242) synthétisent, en présence de TMG, des quantités normales de galactoside-perméase, mais pas de traces décelables de galactosidase. Il est possible, en utilisant ces organismes, de démontrer la concentration intracellulaire de galactosides vrais, tels que l'ONPG ou le lactose, alors que cela est impossible chez les bactéries du type sauvage, le substrat étant hydrolysé à mesure qu'il est concentré.

Le second type de mutants (« cryptiques » ; ML3 et K12W2241) est particulièrement intéressant. En présence de concentrations suffisamment élevées de TMG, ces organismes synthétisent seulement des traces de galactoside-perméase, mais des quantités normales de β -galactosidase. Ces bactéries, tant qu'elles sont physiologiquement intactes, n'hydrolysent l'ONPG et ne métabolisent le lactose qu'avec une extrême lenteur (par comparaison avec une souche sauvage de même activité β -galactosidasique) [tableau VIII].

Ces propriétés des mutants cryptiques qui, jusqu'ici, paraissaient

TABLEAU VII. — Hydrolyse *in vivo* de l'orthonitrophényl- β -D-galactoside par des bactéries normales et par des bactéries dépourvues de galactoside-perméase.

Souches	Type physiologique (métabolisme des galactosides)	Génotype (K12)	Galactoside-perméase		β -galactosidase		Phénotype élémentaire
			B.induites	B.non in- duites	B.induites	B.non in- duites	
ML30 K12	Type normal	--- sauvage	+	O	+	O	$\gamma^+ \underline{z}^+ \underline{i}^+$
ML3 K12W2241	négatif cryptique	--- Lac_1^-	Trace	O	+	O	$\gamma^- \underline{z}^+ \underline{i}^+$
K12W2244 K12W2242	négatif absolu	Lac_1^- Lac_2^-	+	O	O	O	$\gamma^+ \underline{z}^- \underline{i}^+$
ML308 K1284	constitutif normal	--- Lac_1^-	+	+	+	+	$\gamma^+ \underline{z}^+ \underline{i}^-$
ML35 K12W13011	constitutif cryptique	Lac_1^- ; Lac_1^-	O	O	+	+	$\gamma^- \underline{z}^+ \underline{i}^-$
ML3068	négatif absolu	---	+	+	O	O	$\gamma^- \underline{z}^- \underline{i}^-$
ML3080	négatif absolu	---	O	O	O	O	$\gamma^- \underline{z}^- ?$
K12W2247	---	Lac_7^-	Trace	O	Trace	O	?

(*) Essais de la galactosidase et de la galactoside-perméase effectués sur chaque souche après croissance en milieu à 2 p. 1 000 de maltose en présence (B. induites) ou en absence (B. non induites) de TMG (10^{-3} M). Le signe + indique une activité égale ou supérieure à 20 p. 100 de l'activité des bactéries normales induites. Le signe O indique une activité inférieure à 1 p. 100. « Trace » indique une activité de l'ordre de 1 à 5 p. 100.

TABLEAU VIII. — Mutations affectant la β -galactosidase et la galactoside-perméase chez *E. coli* (souches ML et K12) (*).

Bactéries induites (*)	Galactoside-perméase (TMG accumulé en % du poids sec)	β -galactosidase (μ M d'ONPG hydrolysé $\times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	Hydrolyse <i>in vivo</i> (μ M d'ONPG hydrolysé $\times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	Facteur de crypticité (**)
Normales (ML30)	3,1	7.200	255	28
Cryptiques (ML3)	>0,1	6.700	25	270

(*) Bactéries cultivées en présence de TMG 10^{-3} M, lavées, remises en suspension en milieu 56. Activités de la β -galactosidase et de la galactoside-perméase déterminées dans les conditions normales (page 830). Hydrolyse *in vivo* mesurée en présence d'ONPG M/400 et de succinate 2 p. 1 000, en milieu agité.

(**) Noter que les conditions d'hydrolyse *in vivo* ne sont pas strictement comparables aux conditions de détermination de l'activité β -galactosidasique (présence d'ions Na^+ dans le second cas, mais non dans le premier), ce qui peut affecter, en valeur absolue, le facteur de crypticité (rapport de l'hydrolyse *in vitro*, col. 2, à l'hydrolyse *in vivo*, col 3), mais n'en permet pas moins la comparaison des deux souches.

paradoxaux, s'expliquent aisément si la β -galactosidase se trouve effectivement à l'intérieur d'une enceinte osmotique cellulaire très imperméable (au lactose plus encore qu'à l'ONPG), dont le franchissement est assuré par la perméase, qui gouverne ainsi la pénétration et le métabolisme des galactosides.

L'existence de ces deux types de mutants lactose-négatifs et leurs propriétés confirment donc entièrement les hypothèses faites sur le rôle de la perméase et prouvent que ce système est distinct de la β -galactosidase.

L'étude de l'hydrolyse des galactosides par des cellules intactes

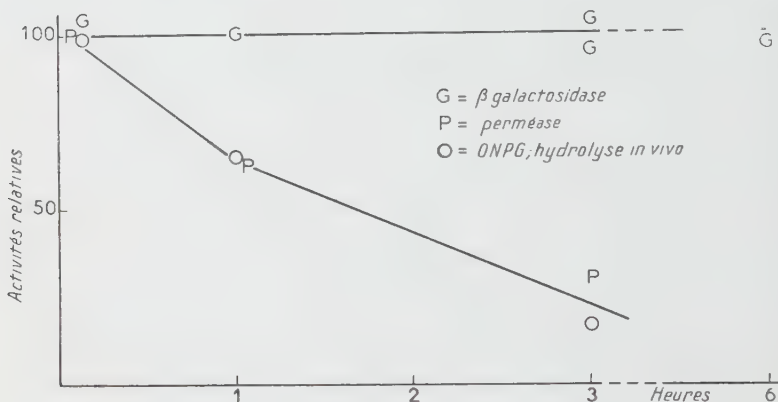


FIG. 8. — Variation relative d'activité de la β -galactosidase, de la galactoside-perméase et de l'hydrolyse de l'ONPG in vivo dans une culture carencée en substrat carboné. — Une culture d'*Escherichia coli* ML 308 (mutant constitutif) en phase de croissance exponentielle sur maltose, est centrifugée, remise en suspension en milieu 56 sans maltose et agitée à 34° C. A 0 heure, 1 heure, 3 heures et 6 heures, on détermine l'activité de la β -galactosidase (suspension toluénisée, cf. p. 830), de la galactoside-perméase (accumulation du TMG, cf. p. 830) et la vitesse d'hydrolyse in vivo de l'orthonitrophényl- β -D-galactoside [ONPG] (cf. p. 830). Pour permettre les comparaisons, la valeur 100 a été attribuée à l'activité initiale, au temps 0 (pour l'activité de la β -galactosidase, la valeur 100 correspond à la moyenne de toutes les déterminations). On voit que la vitesse d'hydrolyse in vivo diminue parallèlement à la perte d'activité de la perméase, tandis que les variations d'activité de la β -galactosidase ne sont pas significatives, même à la sixième heure.

de bactéries du type sauvage permet également de mettre en évidence le rôle fonctionnel de la perméase.

Rappelons d'abord que l'activité hydrolytique des bactéries intactes, à l'égard de l'ortho-nitrophényl- β -D-galactoside est inférieure à l'activité β -galactosidasique extractible de ces mêmes bactéries [14, 26, 45, 43]. Ceci témoigne de l'isolement de la β -galactosidase par rapport au milieu extérieur. L'expérience résumée

par la figure 8 montre que chez les bactéries induites du type sauvage, l'activité de la perméase, plutôt que celle de la β -galactosidase, limite l'activité hydrolytique. On voit en effet que chez des bactéries induites incubées à 34° C pendant quelques heures, l'activité de la perméase diminue fortement, tandis que celle de la β -galactosidase demeure constante. Cependant, l'activité hydrolytique des bactéries intactes diminue parallèlement à la perte d'activité de la perméase.

Un autre exemple met en évidence certaines différences d'affinité spécifique entre la perméase et l'hydrolase. On voit (tableau IV) que, même à ne considérer que les valeurs relatives, le tableau des affinités des deux systèmes pour une série de thiogalactosides révèle des différences très marquées et caractéristiques. Le galactosido- β -D-thiogalactoside (TDG) présente, pour la β -galactosidase, une affinité faible, du même ordre que le TMG. En revanche, l'affinité du TDG pour la perméase est beaucoup plus élevée que celle du TMG. Or, l'hydrolyse *in vivo* des galactosides par des bactéries induites est inhibée beaucoup plus fortement par le TDG que par le TMG. Cela s'explique aisément si, *in vivo*, la perméase gouverne la pénétration des galactosides, et, par conséquent, le fonctionnement de la β -galactosidase.

Nous ne discuterons ici que très brièvement un aspect très important des relations entre la galactoside-perméase et la β -galactosidase, à savoir le rôle de la perméase dans l'induction de la β -galactosidase. Ce problème est discuté ailleurs [34, 8]. Nous soulignerons seulement deux faits essentiels :

1° La concentration de TMG nécessaire pour saturer le système inducteur des mutants cryptiques Lac⁻¹ (dépourvus de perméase) est environ cent fois supérieure à la concentration qui suffit à saturer les bactéries normales. Il est donc clair que chez les bactéries normales, c'est le TMG concentré par la perméase qui induit la β -galactosidase. Chez les cryptiques, l'induction pourrait être due soit à la perméation passive du TMG, soit à des traces d'activité perméasique.

2° L'inductibilité (c'est-à-dire le taux différentiel de synthèse de la β -galactosidase), à une concentration faible de TMG (10^{-5} M), est beaucoup plus élevée chez des bactéries déjà induites que chez des bactéries non induites. Cela tient évidemment à ce que les bactéries induites, possédant une forte activité perméasique, réalisent une forte concentration intracellulaire de l'inducteur, que ne réalisent pas les bactéries non induites [34, 8].

★
★★

Les propriétés des mutants lactose-négatifs, comme celles des bactéries normales, montrent donc que la β -galactosidase et la

galactoside-perméase sont distinctes, mais étroitement associées fonctionnellement. Nous allons voir que les deux systèmes ont également des relations génétiques très étroites.

Relations génétiques de la β -galactosidase et de la galactoside-perméase. — Ces relations sont de deux ordres :

a) D'une part, certaines mutations semblent affecter simultanément les deux systèmes ;

b) D'autre part, plusieurs mutations, affectant soit *séparément*, soit *également* les deux systèmes, forment chez *E. coli* K12 un groupe étroitement lié.

On sait que des mutants qui se distinguent du type sauvage en ce que la synthèse de la β -galactosidase y est *constitutive* et non plus inductible, ont été isolés chez *E. coli* ML et K12 [27, 7]. Or, ainsi que le montre le tableau VII, chez ces organismes (ML308 : K12S4), non seulement la β -galactosidase, mais aussi la perméase, sont formées en l'absence d'inducteur extérieur. La question se pose de savoir si ces organismes sont des mutants doubles chez lesquels des déterminants différents, correspondant respectivement à la perméase et à la galactosidase, auraient chacun *indépendamment* muté vers un allèle « constitutif », ou s'il s'agit d'une mutation unique, affectant simultanément les propriétés d'inductibilité des deux enzymes. C'est la seconde hypothèse qui paraît correcte. En effet, selon la première hypothèse, il pourrait exister des souches à perméase inductible et à galactosidase constitutive, et inversement. Or, de telles souches n'ont pas été trouvées. Il est vrai que les moyens de sélection mis en œuvre pour isoler des mutants constitutifs ne sont efficaces que si les deux systèmes *à la fois* sont constitutifs. Pour éliminer cette ambiguïté, nous avons isolé à partir du type sauvage, un certain nombre de mutants spontanés à β -galactosidase constitutive par la technique directe de Cohen-Bazire et Jolit [7], sans faire intervenir aucun moyen de sélection. Chez les quatre mutants ainsi isolés, la perméase également était constitutive : la mutation constitutive affecte donc simultanément les deux systèmes.

La même conclusion est imposée par l'observation suivante : la souche lactose-négative ML3, à galactosidase inductible cryptique, c'est-à-dire dépourvue de perméase, donne une mutation spontanée lactose-positif relativement fréquente : c'est la classique mutation du « coli mutable » [32, 31, 35, 46]. Cette mutation se traduit ici par l'acquisition d'une perméase *inductible* (*E. coli* type normal). A partir de la souche ML3, nous avons isolé directement un mutant à galactosidase constitutive (ML35). Ces organismes toujours dépourvus de perméase, donc cryptiques, forment de grandes quantités de galactosidase, mais ne se développent pas sur milieux au lactose. Cette souche « constitutive cryptique » donne cependant, avec la même fréquence que la

souche ML3, des mutants lactose-positifs, pourvus de perméase : or, chez ces mutants, la perméase est invariablement *constitutive*. Le caractère constitutif de la perméase chez ces mutants est évidemment lié à la mutation intervenue *antérieurement* et qui, dans ce premier stade, ne se manifestait que sur la galactosidase, la perméase étant absente.

Au total, les mutations en cause se classent en trois types élémentaires que nous définirons et symboliserons comme il suit :

- a) Capacité (y^+) ou incapacité (y^-) de synthétiser la perméase ;
- b) Capacité (z^+) ou incapacité (z^-) de synthétiser la β -galactosidase ;
- c) Caractère inductible (i^+) ou constitutif (i^-) de la synthèse des deux systèmes. Ce dernier phénotype ne peut se manifester que lorsque l'un au moins des précédents est positif.

Dans la dernière colonne du tableau VII, nous avons noté le phénotype complexe correspondant à chaque souche. On voit que toutes les combinaisons prévues selon l'hypothèse précédente sont représentées.

Voyons maintenant dans quelle mesure ces différents types mutants élémentaires se rattachent à des loci définis, alléliques ou non. Nous utiliserons, pour cela, les résultats de J. et E. Lederberg et al. [28, 25], ainsi que ceux de Cohen-Bazire et Jofit [7] concernant les relations d'allélisme de différents mutants lactose-négatifs et « constitutifs » d'E. coli K12, en les interprétant à la lumière des données du tableau VII.

De cette confrontation, les conclusions suivantes se dégagent :

- a) Les mutations se traduisant par la perte de la perméase seule ($y^+ \rightarrow y^-$) ont eu lieu au locus Lac_1 . Il ne semble pas qu'aucune mutation intéressant la galactosidase ait eu lieu à ce locus.
- b) Les mutations se traduisant par la perte de la galactosidase seule ($z^+ \rightarrow z^-$) se rattachent à au moins deux loci différents (Lac_2 et Lac_4) dont l'un (Lac_4) est *très étroitement lié* à Lac_1 .
- c) La mutation constitutive ($i^+ \rightarrow i^-$) doit être rattachée à un locus (Lac_i) distinct de Lac_1 (ainsi probablement que de Lac_4), mais *très étroitement lié* à Lac_1 .

Notons qu'une mutation distincte des précédentes (Lac^{-7}), peu liée à Lac_1 , semble avoir un effet sur les deux systèmes, annulant la perméase et réduisant considérablement la capacité de synthétiser la galactosidase.

La situation, on le voit, n'est pas simple, puisque dans certains cas au moins (Lac_2 et Lac_4), des mutations en des loci non alléliques et peu liés se traduisent par des phénotypes que nous ne pouvons distinguer [28]. Cependant, un fait essentiel se dégage : l'existence d'un locus complexe (Lac_i , Lac_1 , Lac_4) où des mutations très voisines contrôlent, soit électivement, soit simultanément, l'inductibilité et la synthèse de chacun de ces deux systèmes dont

nous avons vu qu'ils sont étroitement associés fonctionnellement. Cette situation rappelle celle qui a été révélée par les observations de Hartman et al. [49] sur des mutations affectant le pouvoir de synthèse de certains métabolites chez *E. coli*, ainsi que par les observations comparables de Pontecorvo et de ses collaborateurs [42] chez *Aspergillus*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

1° LA GALACTOSIDE-PERMÉASE. — L'essentiel des observations que nous avons rapportées et des conclusions qui s'en dégagent peut être résumé comme il suit.

Il existe, chez *E. coli*, un système (la galactoside-perméase) qui a pour propriété d'accumuler les galactosides à l'intérieur de la cellule. Ce système présente les propriétés cinétiques et la spécificité stérique d'un enzyme. Son fonctionnement est couplé à des réactions donatrices d'énergie métabolique. Normalement, chez les souches sauvages, la perméase est inductible. Sa formation, inhibée par les agents qui inhibent la synthèse des protéines, a lieu dans les mêmes conditions, avec la même cinétique caractéristique et en présence des mêmes inducteurs spécifiques que la synthèse de la β -galactosidase. Des mutations *distinctes* affectent la capacité de synthétiser, soit la β -galactosidase, soit la perméase. Les mutants sans galactosidase accumulent les galactosides, mais ne les hydrolysent pas. Chez les mutants sans perméase, la galactosidase est pratiquement inactive *in vivo* (elle est dite cryptique) ; ceci tient à ce que, chez les bactéries vivantes intactes, l'enceinte osmotique cellulaire est imperméable aux glucides ; la galactosidase se trouve à l'intérieur de cette enceinte, de sorte que la galactoside-perméase gouverne *in vivo* l'accessibilité de la β -galactosidase, et, par conséquent, le métabolisme des galactosides, ainsi d'ailleurs que l'induction de la β -galactosidase. A ces relations fonctionnelles entre la galactoside-perméase et la β -galactosidase, font pendant des relations génétiques étroites ; plusieurs loci, qui gouvernent la synthèse et l'inductibilité de la galactosidase et de la perméase respectivement, sont étroitement liés en un locus complexe chez *E. coli* K12.

Autres systèmes perméasiques. — L'hypothèse que l'utilisation des substrats exogènes par les microorganismes est, en premier lieu, déterminée par des propriétés de perméabilité spécifique de la membrane cellulaire, a souvent été évoquée par des microbiologistes. Faute de données expérimentales adéquates, elle suscitait généralement plus d'embarras et d'inquiétude que d'intérêt, et sa validité a été souvent niée [44]. Tout récemment cependant, elle a été reprise et défendue avec vigueur et précision par B. Davis [43]. En revanche, les nombreuses recherches poursuivies

depuis des années sur les phénomènes de sécrétion et d'adsorption dans les tissus et les cellules des organismes supérieurs permettaient difficilement de douter de la sélectivité de certaines membranes cellulaires. Rosenberg et Wilbrandt [48] ont montré que les modalités de transfert de diverses substances organiques non ioniques à travers l'épithélium rénal et l'intestin s'expliquent difficilement sans cette hypothèse. La perméabilité *sélective* des érythrocytes humains à l'égard de certains glucides est bien établie [48, 24, 29]. Depuis 1934, Danielli [10, 11, 12] a développé et illustré l'hypothèse que les membranes des cellules animales et végétales comportent, en règle générale, une couche ou un constituant lipoidique et sont, de ce fait, très peu perméables aux substances polaires telles que les glucides. La perméation rapide et sélective de certains glucides dans certaines cellules, comme les érythrocytes humains, serait due, selon Danielli, à des constituants spécifiques et spécialisés, qu'il suppose être des protéines, et pour lesquels il a envisagé divers mécanismes d'action possibles.

Pour en revenir aux microorganismes, il semble maintenant certain que des systèmes spécifiques analogues à la galactoside-perméase gouvernent la perméation de nombreux substrats, chez *E. coli* comme chez d'autres microorganismes. Cette généralisation est justifiée par de nombreuses observations.

Tout d'abord, il est facile de voir que les propriétés que nous avons dû assigner à la galactoside-perméase impliquent que d'autres systèmes *spécifiques* assurent le transfert des glucides *non-galactosidiques* qu'*E. coli* est capable de métaboliser à une vitesse égale ou supérieure au lactose. Si, en effet, la barrière osmotique cellulaire est imperméable au lactose, il faut qu'elle le soit également au maltose, par exemple, qui, cependant, est rapidement métabolisé par *E. coli*. Mais cette perméation rapide du maltose ne peut pas être le fait d'un système de transfert *non spécifique*, puisqu'un tel système ferait pénétrer le lactose et que, par conséquent, des cellules capables de métaboliser rapidement le maltose ne sauraient être cryptiques à l'égard du lactose. A moins d'admettre que des enceintes osmotiques *différentes* enferment différents enzymes intracellulaires, il faut bien supposer que le métabolisme du maltose *in vivo* chez *E. coli* implique un système de transfert spécifique, assez spécifique en tout cas pour être inactif sur le lactose.

On sait d'ailleurs que le paradoxe de la crypticité spécifique a été rencontré à maintes reprises chez des microorganismes et pour des substrats variés. Il a suscité des spéculations diverses, qu'il est maintenant sans intérêt de discuter. L'exemple de la galactoside-perméase nous permet d'admettre que la crypticité spécifique est due, en règle générale, à l'absence d'une perméase spécifique. Divers exemples de crypticité, intéressant principalement les di-

saccharides, ont été signalés chez la levure [30, 21]. Chez *E. coli*, Doudoroff et al. [16] ont étudié un mutant incapable de métaboliser le glucose libre, mutant qui cependant possédait de l'hexokinase et métabolisait le glucose libéré à partir du maltose par l'amyloamylase *intracellulaire*. Soulignant le paradoxe, Doudoroff [15] a montré qu'on ne pouvait le résoudre qu'en supposant un mécanisme *spécifique* de transfert, présent chez les bactéries normales, absent chez le mutant.

Récemment, Monod, Halvorson et Jacob [39] ont repris l'étude comparée de ce mutant et des bactéries normales. Ils ont constaté que celles-ci possèdent un système constitutif qui accumule réversiblement l' α -méthyl-glucoside (corps qui n'est pas métabolisé par *E. coli*). L'accumulation est très fortement inhibée par le glucose, qui déplace entièrement l' α -méthyl-glucoside déjà accumulé. Ce système, comparable à la galactoside-perméase par ses propriétés cinétiques, est totalement absent chez le mutant glucose négatif, mais il est restitué en même temps que la capacité d'utiliser le glucose, par transduction à l'aide d'un phage issu de la souche sauvage. Ces résultats semblent donc confirmer l'hypothèse de Doudoroff.

Chez *Pseudomonas*, Kogut et Podoski [23], ainsi que Barrett et al. [1], ont montré que le cycle de Krebs était cryptique à l'égard du citrate exogène chez les organismes cultivés en l'absence de citrate, mais que la crypticité disparaissait après une période de croissance en présence de citrate. Cette « adaptation » était inhibée par le rayonnement U.V. [23] ou par des analogues d'acides aminés [1], ce qui indiquait que la disparition de la crypticité était due à la synthèse d'un système « enzymatique » inductible. Green et Davis [18], découvrant une situation toute semblable chez *Aerobacter aerogenes*, ont constaté que la formation du système décryptifiant était inhibée par le glucose, propriété caractéristique de beaucoup de protéines inductibles, comme nous l'avons rappelé à propos de la galactoside-perméase. Ces auteurs ont pu vérifier, en outre, que l'enveloppe osmotique imperméable au citrate correspondait sensiblement au volume total de la cellule, ce qui permet de supposer que le système décryptifiant est effectivement associé à la membrane cellulaire.

Enfin, Cohen et Rickenberg [5, 6] ont récemment découvert chez *E. coli* des systèmes qui accumulent divers acides aminés exogènes. Complétées par celles de Britten et al. [2], leurs observations suggèrent qu'il existe, en fait, un système *distinct* pour chaque acide aminé ou type d'acide aminé naturel. Par toutes leurs propriétés (équilibre, saturation, spécificité, sensibilité aux inhibiteurs métaboliques), ces systèmes sont très proches de la galactoside-perméase. Des expériences de compétition isotopique montrent directement que ces systèmes commandent l'entrée des acides aminés

exogènes dans le métabolisme et, par conséquent, leur incorporation dans les protéines, mais n'interviennent pas dans le métabolisme et l'incorporation des aminoacides endogènes. Ces « aminoacides-perméases » d'*E. coli* ne sont pas inductibles, mais Cohen [3] a pu montrer que leur formation est liée à la synthèse des protéines.

Définition des perméases. — Perméases et transport actif. — Le rapprochement de ces observations nous paraît justifier l'hypothèse que, chez les microorganismes, la membrane cellulaire, ou tout au moins la barrière osmotique qui délimite l'espace métabolique interne, est en général très peu perméable aux substances organiques hydrosolubles et que la pénétration des substrats organiques exogènes est assurée principalement par des systèmes spécifiques, analogues à celui qui concentre les galactosides chez *E. coli*. Pour désigner ces systèmes, nous proposons le terme générique de « perméase ». Mais le mot et la notion ne seront utiles que s'ils sont employés de façon limitative. Nous définirons une perméase comme étant un système de nature protéinique assurant le transfert catalytique d'un substrat à travers une barrière osmotique cellulaire, possédant les propriétés de spécificité stérique et la cinétique d'activité d'un enzyme, mais distinct et indépendant des enzymes assurant le métabolisme proprement dit du substrat. Cette définition ne préjuge pas du mécanisme d'action des perméases, mais elle implique deux hypothèses essentielles :

a) Que le transfert perméasique comporte la formation transitoire d'un *complexe spécifique* entre la protéine de la perméase et le substrat ;

b) Que la perméase est un système *fonctionnellement spécialisé*, n'intervenant pas dans le métabolisme intracellulaire proprement dit.

C'est à dessein que nous n'avons pas inclus dans cette définition la condition que la perméase catalyse un « transport actif », c'est-à-dire une réaction de transfert contre un gradient de concentration ou d'activité. En effet, même dans le cas de la galactoside-perméase et des aminoacides-perméases d'*E. coli*, on ne peut affirmer que les substrats « concentrés » soient réellement « libres » en totalité, et en solution dans le milieu intérieur, dans une phase identique au milieu extérieur. On ne peut donc, avec certitude, parler de gradient de concentration. Ceci s'applique *à fortiori* au système citrate-perméase, révélé seulement par « décryptification ». Il est, *a priori*, possible que l'activité de certains systèmes perméasiques ne se traduise pas par une accumulation sensible de substrat, même lorsque celui-ci n'est pas métabolisé. Inversement, l'accumulation active d'une substance pourrait évidemment s'opérer par des mécanismes n'impliquant pas de perméases, au sens défini plus haut. Il doit donc être clair que per-

méase ne suppose pas nécessairement transport actif, ni inversement.

Perméase et enzyme. — L'étude de la seule activité *in vivo* ne permet évidemment pas d'identifier sans ambiguïté un système enzymatique. Cependant, dans le cas de la galactoside-perméase, plusieurs critères distincts : affinité spécifique, inductibilité spécifique, mutations spécifiques, aboutissent à des définitions convergentes et individualisent très nettement ce système. Mais ces critères ne mettent en évidence que le constituant spécifique du système, et ne donnent pas d'indication sur son mode d'action. Il est donc inutile, pour l'instant, de discuter les mécanismes possibles et de se demander si la perméase est ou non un enzyme. D'un enzyme, nous savons déjà qu'elle a la spécificité stérique, la cinétique d'action, l'inductibilité. Nous savons que certaines mutations l'affectent en même temps et de la même façon que la β -galactosidase. Nous avons des témoignages indirects de sa nature protéinique. Pour qu'il s'agisse d'un enzyme au sens habituel du mot, il faudrait encore que la perméase catalyse une réaction du substrat, c'est-à-dire la formation ou la rupture d'une liaison covalente. Cela est possible et même vraisemblable, mais non certain, et des mécanismes peuvent être imaginés, qui n'impliqueraient pas formation ou rupture de liaisons covalentes intéressant le substrat [41]. Cette alternative est la première que posera l'étude du mécanisme d'action des perméases.

RÉSUMÉ.

Il existe, chez *Escherichia coli*, un système (la galactoside-perméase) dont l'activité se traduit par l'accumulation intracellulaire des galactosides exogènes. La formation de ce système est induite spécifiquement par certains galactosides ; elle est liée à la synthèse des protéines. L'activité de la galactoside-perméase, conforme à la loi de Michaelis-Henri, est inhibée par l'azoture de sodium et le 2,4-dinitrophénol. La galactoside-perméase gouverne la pénétration des galactosides dans les cellules et leur hydrolyse par la β -galactosidase. Des mutations spécifiques et distinctes affectent la capacité de synthétiser la galactoside-perméase et la β -galactosidase respectivement. Une mutation unique détermine le caractère inductible ou constitutif des deux systèmes.

Sur la base de ces observations, rapprochées de nombreuses autres, l'hypothèse est proposée que la pénétration intracellulaire des substrats organiques du métabolisme chez les microorganismes est, en général (et plus particulièrement dans le cas des substances fortement polaires), catalysée par des *perméases* spécifiques dont la galactoside-perméase serait un modèle.

SUMMARY.

There exists, in *E. coli*, a system (galactoside-permease) the activity of which is expressed by the intracellular accumulation of exogenous galactosides. The formation of this system is specifically induced by certain galactosides; it is linked to protein synthesis. The activity of galactoside-permease follows the Michaelis-Henri's law and is inhibited by sodium azide and 2,4-dinitrophenol. Galactoside-permease controls the penetration of galactosides into the cells and their hydrolysis by β -galactosidase. Specific and distinct mutations affect respectively the capacity to synthesize galactoside-permease and β -galactosidase. A single mutation determines the inducible *vs* constitutive character of both systems.

On the basis of these and of many other observations, we propose the hypothesis that intracellular penetration of organic substrates (and especially of highly polar substances) is, in general, catalyzed in microorganisms by specific permeases similar to galactoside-permease.

*
* *

Nous tenons à adresser nos remerciements à M. Helferich, Directeur du Chimisches Institut de l'Université de Bonn, et à M. D. Turk, qui ont étudié et réalisé la synthèse de nombreux thiogalactosides. Nous remercions également M. J. Lederberg, de l'Université du Wisconsin (U.S.A.), qui nous a fait parvenir un certain nombre de souches mutantes d'*Escherichia coli* K12.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARRETT (J. T.), LARSON (A. D.) et KALLIO (R. E.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 187-192.
- [2] BRITTEN (R. J.), ROBERTS (R. B.) et FRENCH (E. F.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1955, **41**, 863.
- [3] COHEN (G. N.). (Résultats inédits.)
- [4] COHEN (G. N.) et RICKENBERG (H. V.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 466-468.
- [5] COHEN (G. N.) et RICKENBERG (H. V.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2086-2088.
- [6] COHEN (G. N.) et RICKENBERG (H. V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 693.
- [7] COHEN-BAZIRE (G.) et JOLIT (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 937-945.
- [8] COHN (M.). *Henry Ford Hospital Intern. Symp. « Enzymes : Units of biological structure and function »*. Acad. Press. Inc., édit., New-York, 1956, 41-46.

- [9] COHN (M.) et MONOD (J.). *Symp. « Adaptation in Microorganisms »*, Cambridge Univ. Press, 1953, 132-149.
- [10] DANIELLI (J. F.). *Symp. Soc. Exptl. Biol. : « Structural aspects of cell physiology »*, 1952, **6**, 1-15.
- [11] DANIELLI (J. F.). *Symp. Soc. Exptl. Biol. : « Active transport and secretion »*, 1954, **8**, 502-516.
- [12] DANIELLI (J. F.). *7th Symp. Colston Res. Soc.*, Colston Papers, Butterworths Scientific, édit., London, 1954, 14 p.
- [13] DAVIS (B. D.). *Henry Ford Hospital Intern. Symp. « Enzymes : Units of biological structure and function »*, Acad. Press Inc., édit., New-York, 1956, 509-522.
- [14] DEERE (C. J.), DULANEY (A. D.) et MICHELSON (I. D.). *J. Bact.* 1939, **37**, 355.
- [15] DOUDOROFF (M.). *Phosphorus metabolism*, 1951, **1**, 42-48.
- [16] DOUDOROFF (M.), HASSID (W. Z.), PUTNAM (E. W.), POTTER (A. L.) et LEDERBERG (J.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 921-933.
- [17] GALE (E. F.). *Bact. Rev.*, 1943, **7**, 139-173.
- [18] GREEN (H.) et DAVIS (B. D.). *In DAVIS (B. D.), Henry Ford Hospital Intern. Symp. (Cf. [13])*.
- [19] HARTMAN (P. E.) et al. *In DEMEREC (M.), Henry Ford Hospital Intern. Symp. (Cf. [13])*, 131-134.
- [20] HERZENBERG (L.). (En préparation.)
- [21] HESTRIN (S.) et LINDEGREN (C. C.). *Arch Biochem.*, 1950, **29**, 315-333.
- [22] HOGNESS (D. S.), COHN (M.) et MONOD (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 99-116.
- [23] KOGUT (M.) et PODOSKI (E. P.). *Biochem. J.*, 1953, **55**, 800-811.
- [24] KOZAWA. *Biochem. Z.*, 1914, **60**, 231.
- [25] LEDERBERG (E. M.). *Genetics*, 1952, **37**, 469-483.
- [26] LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1950, **60**, 381-392.
- [27] LEDERBERG (J.) *In Genetics in the 20th Century*, Mac Millan édit., New-York, 1951, 263-289.
- [28] LEDERBERG (J.), LEDERBERG (E. M.), ZINDER (N. D.) et LIVELY (E. R.). *Cold Spring Harbor Symp. on quantitative Biol.*, 1951, **16**, 413-441.
- [29] LE FÈVRE (P. G.). *Symp. Soc. Exptl. Biol., « Active transport and secretion »*, Acad. Press Inc., édit., New-York, 1954, **8**, 118-135.
- [30] LEIBOWITZ (J.) et HESTRIN (S.). *Adv. in Enzymol.*, 1945, **5**, 87-127.
- [31] LEWIS (I. M.). *J. Bact.*, 1934, **28**, 619.
- [32] MASSINI (R.). *Arch. Hyg.*, 1907, **61**, 250-292.
- [33] MONOD (J.). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann, édit., Paris, 1942.
- [34] MONOD (J.). *Henry Ford Hospital Intern. Symp. « Enzymes : Units of biological structure and function »*. Acad. Press Inc., édit., New-York, 1956, 7-28.
- [35] MONOD (J.) et AUDUREAU (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 868-878.
- [36] MONOD (J.), COHEN-BAZIRE (G.) et COHN (M.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585-599.
- [37] MONOD (J.) et COHN (M.). *Adv. in Enzymol.*, 1953, **13**, 67-119.
- [38] MONOD (J.) et COHN (M.). *Congrès de Microbiol. Symp. sur le métabolisme bactérien*, Rome, 1953, 42-62.

- [39] MONOD (J.), HALVORSON (H. O.) et JACOB (F.). (Résultats inédits.)
- [40] MONOD (J.), PAPPENHEIMER (A. M. Jr) et COHEN-BAZIRE (G.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 647-660.
- [41] MUNIER (R.) et COHEN (G. N.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 592-593.
- [42] PONTECORVO (G.), ROPER (L.M.), HEMMONS (K.D.), MACDONALD (A.W.) et BUFFON (A. W. J.). *Adv. Genetics*, 1950, **3**, 73-115.
- [43] RICKENBERG (H. V.). Ph. D. Thesis, Yale University, 1954.
- [44] ROBERTS (R. B.), ABELSON (P. H.), COWIE (D. B.), BOLTON (E. T.) et BRITTEN (R. J.). *Studies of biosynthesis in « Escherichia coli »*. Carnegie Institute, Washington D. C., 1955, 521 p.
- [45] ROTMAN (B.). *Bact. Proc.*, 1955, 133.
- [46] RYAN (F. J.). *J. gen. Microbiol.*, 1952, **7**, 69-88.
- [47] TURK (D.). Thèse, Chemisches Institut der Universität, Bonn, 1955.
- [48] WILBRANDT (W.). *Symp .Soc. Exptl. Biol. : « Active transport and secretion »*, Acad. Press Inc., édit., New-York, 1954, **8**, 136-162.

SPECTRES D'ACTION DE LA PHOTO-RESTAURATION CHEZ *E. COLI* B/r

par JOHN JAGGER (*) et RAYMOND LATARJET (**).
(avec la collaboration technique de BERNARD MUEL).

(Institut Pasteur. Service de Radiobiologie et Cancérologie)

Le mécanisme de la photo-restauration (P.R) de certaines lésions cellulaires produites par les rayons U. V. de courte longueur d'onde, reste encore inexpliqué. Il est à première vue surprenant que le développement de lésions amorcées par des photons de 5 eV soit entravé par l'absorption de photons d'environ 3 eV. Deux traitements si proches l'un de l'autre ne peuvent aboutir à des effets si opposés que par la mise en jeu initiale de groupes chromophores différents (qui d'ailleurs peuvent appartenir aux mêmes molécules complexes). Ceux qui correspondent aux photons de 5 eV appartiennent assurément aux nucléoprotéines ; mais on ignore encore ceux de la PR, et sans doute est-il nécessaire de les identifier pour obtenir une idée du mécanisme de cette PR. En principe, le spectre d'action, c'est-à-dire la « courbe spectrale d'efficacité restauratrice monochromatique relative » devrait être très proche du spectre d'absorption du (ou des) chromophore(s) de la PR, donc en suggérer la nature.

Quatre études spectrales ont été effectuées à ce jour sur des bactéries : Kelner [1] sur *E. coli* B/r ; Dulbecco [2] sur le bactériophage T2 ; Helmke [3] sur *E. coli* B ; et Stuy [4] sur 3 souches de *Bacillus*. Dans tous ces cas la lésion était provoquée par la radiation UV 2537 Å, et la recherche d'un effet spectral fut poursuivie avec des moyens rudimentaires n'apportant que des résultats limités. Le domaine des radiations restauratrices s'étend approximativement de 3 100 à 5 000 Å. Au sein de ce domaine, Stuy n'a utilisé que 2 radiations, Helmke 3, Dulbecco 5, toutes isolées par des filtres à partir du spectre de raies de la vapeur de mercure. Kelner, à qui l'on doit la tentative la plus poussée à ce jour, a utilisé en outre des bandes prises au spectre continu d'émission

(*) Postdoctoral Fellow of the National Foundation for Infantile Paralysis (U. S. A.). Adresse actuelle : Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn. U. S. A.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

du tungstène chauffé, mais celles-ci, isolées par des filtres, étaient larges et mal définies.

Du point de vue expérimental, une telle étude se heurte à deux exigences antagonistes, à savoir : luminosité et pureté spectrale. Afin de produire des PR mesurables, il faut des flux lumineux suffisamment intenses ; afin d'obtenir des points nombreux et bien définis, il faut des faisceaux lumineux suffisamment monochromatiques et purs, c'est-à-dire exempts de contaminations spectrales. Or, le monochromatisme et la pureté ne sont obtenus qu'au détriment de la luminosité.

La mise en service d'un monochromateur double géant à optique de quartz nous a permis de concilier ces exigences en un compromis acceptable. La présente étude se rapporte aux spectres d'action de la survie d'*E. coli* B/r et de l'aptitude du phage T2 à se multiplier au sein de cette bactérie. Nous nous sommes efforcés de déterminer des spectres aussi détaillés et précis que possible ; une fois en possession de ceux-ci, nous avons recherché quelles interprétations biologiques ils suggèrent.

MATÉRIEL.

Les germes utilisés furent la bactérie *Escherichia coli*, souche B/r, et le phage T2 actif sur cette bactérie. B/r fut choisie parce qu'elle est non restaurable par la chaleur [5], peu restaurable par la catalase [6] et très restaurable par la lumière. T2 fut choisi pour sa forte photo-restaurabilité [7]. Les bactéries étaient cultivées en milieu synthétique liquide M9 [8], et étalées en boîtes de Petri sur un milieu gélosé constitué de 5 g de bacto-tryptone Difco, 8 g de bacto-peptone Difco, 8 g de bacto-agar et 5 g NaCl pour 1 l d'eau.

La source d'UV était une lampe à vapeur de mercure à basse pression Mazda, du type « germicide », dont le rayonnement UV est représenté pour plus de 90 p. 100 par la radiation 2537 Å.

Comme sources de radiations restauratrices, nous avons utilisé :

a) Une lampe à vapeur de mercure à haute pression de 500 watts Philips S.P.500, à enveloppe de quartz refroidie par une circulation d'eau. Outre les raies du mercure, cette source émet entre 3 000 et 5 000 Å un fond continu d'intensité approximativement constante correspondant à environ $1/5^3$ de l'intensité de la raie λ 4047 pour des bandes larges de 150 Å.

b) Dans certains cas, pour les radiations de $\lambda > 3900$, un arc au xénon à haute pression (Osram) de 150 watts. Vers 4040 Å l'intensité du fond continu émis par cette seconde lampe était environ trois fois moindre que celle du fond continu de la lampe à vapeur de mercure.

La spectrophotométrie de ces lampes fut effectuée au laboratoire par M. B. Muel. Le monochromateur a été spécialement conçu par l'un de nous pour l'expérimentation biologique, puis construit par l'Institut d'Optique de Paris sur les calculs de H. Wihlm [9]. Il est du type « double soustractif », avec deux parties symétriques. La première disperse, la seconde purifie. L'ensemble comprend 6 miroirs d'aluminium sur verre (4 plans et 2 sphériques), 3 fentes hautes de 53 mm et 2 prismes (angle au sommet 60°, base 135 mm de côté, hauteur 135 mm) taillés dans le même bloc de quartz droit. Le chemin optique comprend 8 réflexions et 4 traversées de prisme. La dispersion est égale à 53 Å/mm, à 5 000 Å, et 9,3 Å/mm à 3 000 Å. La transmission est égale à 11 p. 100 à 5 000 Å, et 6 p. 100 à 3 000 Å. La largeur des bandes utilisées (120 Å en moyenne, voir tableau I) était calculée d'après la courbe de dispersion, en tenant compte de l'élargissement produit par l'aberration sphérique et la courbure du champ. La courbure des raies était corrigée pour 3 000 Å ; (il n'y a pas de coma dans un appareil soustractif).

TABLEAU I.

Longueur d'onde (Å)	Fente (mm.)	Bande (Å)	Intensité max. relative	Bactéries				Phages			
				Intensité (ergs/mm. ² sec)	Temps (min.)	Dose (ergs/mm. ²)	S (xx)	Intensité	Temps (min.)	Dose (ergs/mm. ²)	S (xx)
3040	4	86	7,0	12	-	-	0	12	-	-	0
3132 #	4	93	24,	42	32	80,000,	32	16	70	67,000	15
3240	4	103	9,2	16	58	56,000,	45	16	32	31,000	29
3341 #	4	114	18,	32	39	74,000,	33	16	28	25,000	35
3455	3	97	5,8	10	58	35,000,	68	10	25	14,900	57
3555	3	105	6,6	12	46	33,000,	68	12	18	12,800	65
3650 #	2	79	43,	76	11	50,000,	44	16	19	17,900	45
3760	3	125	21,	36	18	39,000,	55	16	15	14,400	54
3900	3	142	18,	32	21	40,000,	52	16	14	13,700	55
4047 #	3	162	100,	180	5	50,000,	40	16	19	18,500	39
4200	3	185	34,	60	24	87,000,	22	16	25	24,000	29
4358 #	2	147	98,	170	30	310,000,	6,0	80	15	71,000	9,4
4600	3	262	28,	50	210	630,000,	2,8	50	83	250,000	2,5
4900	3	339	24,	42	400	1000,000,	1,7	42	-	-	0

(x) Longueur d'onde au centre de la bande utilisée. # Indique que la bande comprend une forte raie de mercure. ## Intensité incidente sur les bactéries (deux fois l'intensité incidente sur la cuve à cause de la réflexion sur le fond). S (xx) Efficacité relative par quantum.

TECHNIQUE D'IRRADIATION.

Les germes étaient exposés aux UV, suspendus dans un liquide transparent, en couche mince. Le flux UV incident (λ 2537 Å) était mesuré en unités d'énergie au moyen du dosimètre de Latarjet [40].

Une dose de $1\,800\text{ ergs mm}^{-2}$ était administrée aux bactéries, une dose de 270 ergs mm^{-2} aux phages, laissant dans les deux cas une survie égale à 10^{-3} .

Pour la PR, le faisceau de la source était concentré sur la fente d'entrée du monochromateur par une lentille plan-convexe de quartz de 10 cm de diamètre. Le faisceau horizontal issu du monochromateur était réfléchi à la verticale par un miroir sphérique incliné à 45° qui le concentrait sur une cuve ouverte en plexiglas large de 1 cm, longue de 2 cm, et profonde d'1 cm. Le fond de cette cuve était fait d'une mince couche de quartz recouverte d'un film d'aluminium sur sa face externe. Celle-ci, sans être en contact avec la suspension, doublait la dose de lumière. L'absorption des échantillons était négligeable aux concentrations utilisées. La partie inférieure de la cuve plongeait dans un bain d'eau à 37° . Un diaphragme étanche disposé autour de la cuve évitait la condensation de la vapeur d'eau venant du bain sur la surface du miroir sphérique. L'ensemble était placé dans une boîte étanche à la lumière extérieure, en sorte que seule la lumière issue du monochromateur pouvait atteindre la cuve. Un dispositif à tiroir permettait de substituer à la cuve une thermopile afin de mesurer le flux lumineux et d'en contrôler la constance au cours des expériences de longue durée. Ce flux était modifié à volonté, en agissant sur la largeur de la fente d'entrée.

TECHNIQUES BIOLOGIQUES.

BACTÉRIES. — La souche d'origine était conservée à 5° sur gélose inclinée. Chaque mois un échantillon lui était prélevé, cultivé une nuit en milieu synthétique M9 aéré à 37° . Cette culture, dite « principale », était conservée à 5° pendant un mois. Chaque semaine, $0,1\text{ cm}^3$ de la culture principale était ensemencé dans 10 cm^3 de milieu M9 et cultivé pendant seize heures à 37° , avec barbotage d'air. Cette culture était ensuite lavée deux fois avec du milieu M9 sans glucose, puis maintenue une heure à 37° avec aération, pour séparer les bactéries. On avait ainsi affaire à des bactéries carencées en glucose pendant la phase de croissance logarithmique. Cette seconde culture, dite « hebdomadaire » était conservée à 5° pendant une semaine, séjour au cours duquel elle perdait 5 p. 100 seulement des cellules capables de former une colonie. Il fut observé qu'après ce séjour, il suffisait d'ajouter du glucose et de porter la culture à 37° pour qu'elle reprît aussitôt sa croissance à la même vitesse qu'avant.

Une aliquote de la culture hebdomadaire était diluée deux cents fois en milieu M9 (concentration $3 \times 10^6\text{ cm}^{-3}$), puis soumise à l'irradiation UV dans l'obscurité. Ainsi qu'il a été déjà mentionné, la « survie à l'obscurité » était 10^{-3} (concentration 3×10^3).

Aussitôt après l'irradiation, les bactéries étaient mises à 5° à l'obscurité. Elles y étaient conservées pendant la prise des échantillons destinés à la PR.

Chaque échantillon, de 1 cm³, était porté dans la cuve à la sortie du monochromateur, et illuminé à 37°. Les expositions durèrent de cinq à soixante minutes selon la longueur d'onde. La température de 37° fut choisie parce qu'elle favorise de bonnes restaurations par des expositions abrégées. Des aliquotes de 0,1 cm³ étaient prélevées de temps en temps, diluées dix ou vingt fois en solution saline à 0°, puis étalées sur gélose en boîtes de Petri. Toutes ces manipulations étaient effectuées soit à l'obscurité, soit à la lumière rouge. Les colonies étaient dénombrées sur les boîtes après vingt-quatre heures d'incubation à 37° à l'obscurité.

En général, 8 longueurs d'onde différentes étaient utilisées le même jour sur la même préparation irradiée, dans le but de réduire les aléas de variabilité quotidienne non contrôlée. On commençait et on terminait avec λ 4047 Å, afin de vérifier la constance de la restaurabilité de la préparation irradiée au cours des heures que duraient les illuminations. Les expériences témoins ont montré les faits suivants :

1° L'échantillon irradié maintenu à 5° conserve sa restaurabilité pendant huit heures au moins. A 37°, la restaurabilité de nos bactéries carencées baisse d'un facteur de 1,5 en une heure.

2° On peut, sans affecter les résultats, conserver les bactéries pendant deux heures à 5° entre l'illumination et l'étalement sur gélose.

3° La réciprocité entre temps d'illumination et débit de radiation est satisfaite dans nos conditions habituelles, c'est-à-dire pour des temps d'exposition de cinq à quatre-vingt-dix minutes.

4° La « survie à l'obscurité » double si les bactéries irradiées sont maintenues pendant huit heures à 5° avant l'étalement. Il est facile de tenir compte de ce fait, lequel d'ailleurs n'influence guère les résultats, en intervertissant d'une expérience à l'autre l'ordre d'utilisation des longueurs d'onde.

PHAGES. — Le stock de phage T2 était une suspension dialysée titrant 5.10^{10} particules cm⁻³, et conservée à 5°. Chaque mois un échantillon lui était prélevé, dilué dix fois en M9, et conservé à 5° pendant un mois. Au cours de cette période le titre de cette suspension secondaire baissait de 50 fois.

La suspension secondaire était diluée mille fois en M9 (concentration 5.10^6) et exposée en couche mince à une dose de 270 ergs mm⁻² d'UV. La survie était d'environ 3×10^{-3} . Aussitôt après l'irradiation, on ajoutait des bactéries B/r de la « culture

hebdomadaire » de façon à mettre finalement en présence 10^8 bactéries pour $4 \cdot 10^6$ particules de phage par centimètre cube. Un contact de quinze minutes à 37° assurait l'adsorption irréversible de plus de 90 p. 100 des phages. Après quoi la suspension était refroidie à 0° .

La PR était conduite de la même manière que pour les bactéries.

Après illumination, les complexes étaient étalés avec des bactéries indicatrices, en l'occurrence une culture de B/r en bouillon en fin de croissance logarithmique. Les plages étaient dénombrées après dix-huit heures d'incubation à l'obscurité.

Dans le cas présent des complexes, nous avons constaté que la réciprocité entre temps et débit n'est valable que pour les débits inférieurs à $10 \text{ ergs mm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$, ce qui est en accord avec les résultats de Dulbecco [2]. Nous n'avons utilisé, dans ces expériences sur les complexes, que les débits inférieurs à 10 ergs, mais aussi proches que possible de cette valeur maximum, de manière à limiter autant que possible les difficultés inhérentes aux longues expositions et à la mesure des faibles débits. Du moins avons-nous de la sorte toujours opéré dans des conditions de réciprocité satisfaisantes.

ANALYSE. — Les résultats expérimentaux furent analysés sur le modèle de Kelner [1]. Nous définissons le « degré de PR » par le rapport $L - O/N - O$, dans lequel N représente le nombre initial des germes irradiés, O le nombre des survivants à l'obscurité, et L le nombre des survivants à la lumière.

La valeur $O/N = 10^{-3}$ du taux de survie à l'obscurité a été choisie de manière à réaliser un compromis entre les deux considérations suivantes : plus la survie est basse plus la PR est évidente, et mieux on la mesure, mais plus les effets secondaires risquent de perturber l'effet primaire restaurable ; en revanche, plus la survie est élevée, plus difficile il devient de mesurer la PR.

Si l'on porte en abscisses le log. de la dose d'une radiation restauratrice λ , exprimée en ergs mm^{-2} , et en ordonnées le log du « degré de PR » correspondant, on obtient une courbe dont la partie médiane est rectiligne (fig. 1). La dose $D_{1\lambda}$ nécessaire pour obtenir un degré de PR égal à 0,01 (c'est-à-dire pour élever le taux de survie de 10^{-3} à 10^{-2} , ou encore pour restaurer 1 p. 100 des germes inactivés) se place sensiblement au centre de la portion rectiligne de chaque courbe. L'« efficacité restauratrice relative » de la radiation λ peut être définie par l'inverse de cette dose, soit

$$E_\lambda = 1/D_{1\lambda}.$$

Enfin, cette efficacité peut être rapportée à celle d'un photon, en se rapportant à une radiation de référence, 4047 Å, par exemple,

ce qui, dans le cas présent, nous amène à définir l' « efficacité relative par quantum ».

$$e_{\lambda} = \frac{1}{D_{1\lambda}} \times \frac{4047}{\lambda (\text{\AA})}$$

Il nous a paru légitime de représenter le spectre d'action de la PR par la courbe $e_{\lambda} = f(\lambda)$ de variation spectrale de e_{λ} . Cette

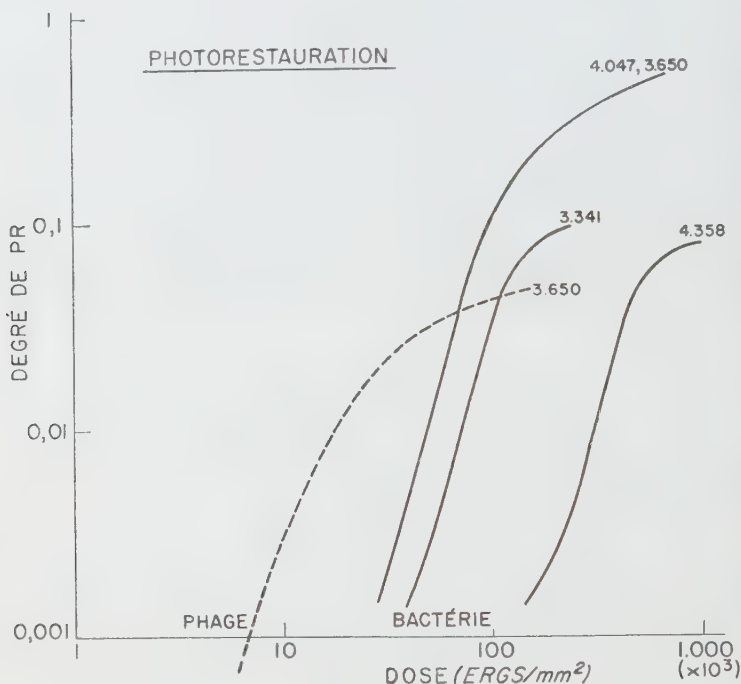


FIG. 1. — « Degré de PR » en fonction de la dose de radiation restauratrice pour diverses longueurs d'onde. Trait plein : B/r ; pointillés : T2. Pour la bactérie les tracés sont rectilignes de part et d'autre du degré 0,01 ; pour le phage, il n'y a pas de fraction du tracé rigoureusement rectiligne.

représentation est conforme aux définitions d'un spectre d'action et de l'efficacité relative monochromatique, cette dernière étant l'inverse de la dose de radiation nécessaire pour produire un effet donné (Cf. par ex. Loofbourow [11]). Cette représentation a en outre l'avantage d'éviter certaines difficultés. On aurait pu, par exemple, considérer la courbe qui donne, en fonction de la dose de lumière, le logarithme de la fraction des

germes restaurables qui n'ont pas été restaurés [2]. On obtient ici une courbe à un coup pour les phages T2 et une courbe à coups multiples pour les bactéries B/r (fig. 2). En fondant sur ces

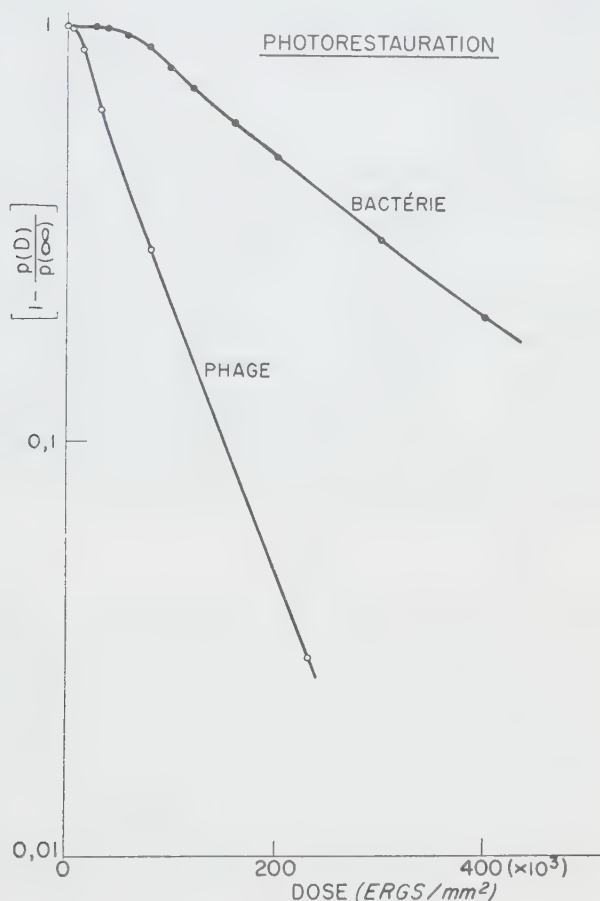


FIG. 2. — Fraction des germes photo-restaurables qui n'ont pas été restaurés. $p(D)$ est le nombre des germes restaurés par la dose D . $p(\infty)$ est le nombre total des germes photo-restaurables. Température : 37° . Pour le phage, la courbe est presque à « un coup » ; pour la bactérie, elle est entre un et deux coups.

courbes un critérium d'efficacité, en prenant par exemple l'inverse de la dose qui restaure 50 p. 100 des germes restaurables, on obtiendrait un spectre d'action déformé par le fait que les plateaux de saturation de la PR ne se situent pas au même niveau

pour les diverses radiations (fig. 1). En choisissant au contraire l'inverse de la dose 1 p. 100, précédemment définie, on s'est affranchi de cette situation disparate des plateaux.

Dans chaque expérience, 5 à 8 radiations étaient utilisées sur le même échantillon. Pour chacune d'elles on utilisait 2 doses encadrant la dose 1 p. 100 sur la portion rectiligne de la courbe correspondante de la figure 1. Une fois $D_{1\lambda}$ déterminée par interpolation, on calculait e , et on portait les points obtenus sur un diagramme en fonction de λ .

D'un jour à l'autre, quelques fluctuations furent observées, dues à des variations biologiques incontrôlables de la culture. Les moyennes des valeurs *relatives* obtenues avec 14 longueurs d'onde différentes au cours d'une douzaine d'expériences comportant chacune de 5 à 8 longueurs d'onde, furent alors calculées, avec le degré de précision attaché à chacune d'elles. Elles permirent de tracer le spectre d'action en échelle logarithmique. Cette échelle fut adoptée pour deux raisons : 1° elle rend le spectre indépendant de la concentration et permet, en particulier, de comparer directement les spectres des bactéries et des phages ; 2° la plupart des spectres d'absorption étant représentés de cette manière, elle facilite la comparaison du spectre d'action avec les courbes d'absorption d'éventuels chromophores.

RÉSULTATS.

La figure 3 montre le spectre d'action pour la PR de l'aptitude à former des colonies chez *E. coli* B/r. Le maximum de la « déviation standard de la moyenne » qui fut observé est figuré au point 3650 Å. Dans tous les cas la déviation standard fut inférieure à 10 p. 100.

La « résolution » de cette courbe est grande. Le tableau I montre que la largeur des bandes utilisées fut de 120 Å en moyenne. En aucun cas une bande n'a empiété significativement sur sa voisine. Par exemple, avec la lampe à vapeur de mercure, la bande à 3900 contenait moins de 1 p. 100 de la raie voisine très intense 4047. Aucune pureté semblable ne peut être obtenue avec des filtres même interférentiels.

Le spectre de la figure 3 présente trois caractères importants : 1° les vallées à 3341 et à 3650, et par suite le pic à 3500, sont de faible amplitude mais significatifs ; 2° la PR est presque constante entre 3140 et 4100, ce qui témoigne d'une PR notable au-dessous de 3650 ; 3° de part et d'autre de cet intervalle spectral, on observe une chute rapide.

La dose 1 p. 100 pour les radiations les plus efficaces est environ 40 000 ergs mm^{-2} . La question se pose de savoir si une telle

dose ne produit pas, à côté de la PR, un effet létal antagoniste. Une telle dose ne commence à manifester un effet létal appréciable (10 p. 100) sur des bactéries normales qu'à λ 3040 Å. Ceci est en accord avec les données de Hollaender [42] d'après lesquelles les radiations restauratrices produisent un effet létal notable sur

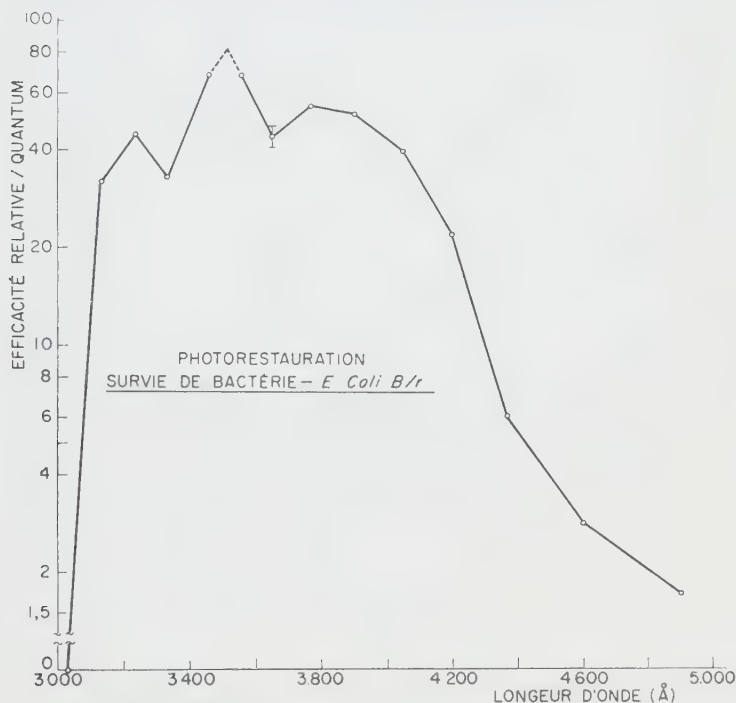


FIG. 3. — Spectre d'action pour la photo-restauration de l'aptitude de *E. coli* B/r à former des colonies. La « déviation standard de la moyenne » pour tous les points de la partie centrale de la courbe est indiquée pour λ 3650 Å. Température : 37°.

E. coli à des doses très élevées, de l'ordre de 10^6 ergs mm^{-2} . Il est vrai que cet effet fut étudié sur des bactéries normales. On peut se demander si l'irradiation préalable par l'UV 2537 Å ne rend pas les bactéries plus sensibles à l'effet létal des radiations de grandes longueurs d'onde. Mais l'existence d'une telle sensibilisation ne peut être mise en évidence à cause de la PR. On est cependant tenté d'attribuer, du moins en partie, la chute du

spectre d'action à partir de 3 200 Å à l'apparition d'un certain effet létal.

La figure 4 montre le spectre d'action pour la PR de l'aptitude du phage T2 à se multiplier chez *E. coli* B/r. La « déviation standard de la moyenne » est du même ordre que pour la PR de la bactérie. La restaurabilité est plus élevée : la

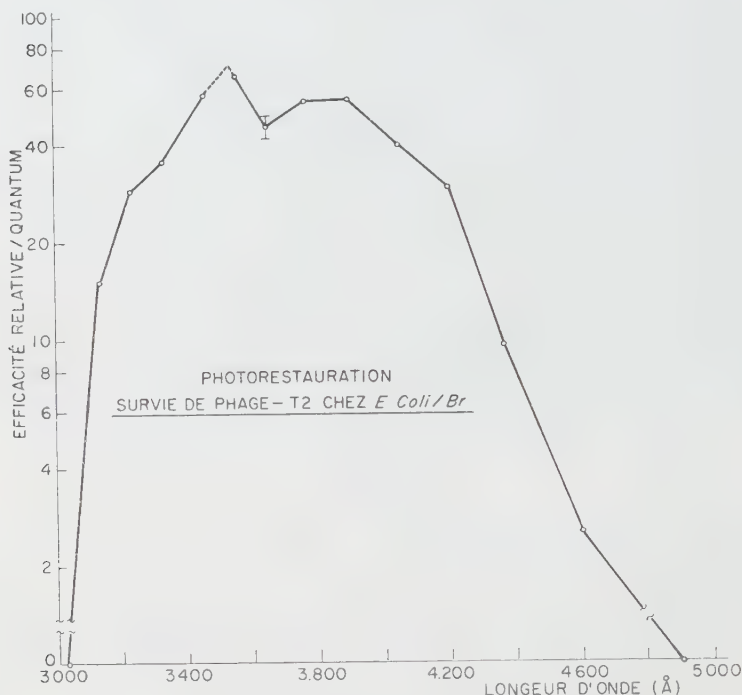


FIG. 4. — Spectre d'action pour la photo-restauration de l'aptitude du phage T2 à pousser chez *E. coli* B/r. La « déviation standard de la moyenne » pour tous les points de la partie centrale de la courbe est indiquée pour λ 3650 Å. Température : 37°.

dose 1 p. 100 pour les radiations les plus efficaces est seulement environ 15 000 ergs mm^{-2} , soit le tiers de la dose 1 p. 100 pour les bactéries. La vallée à 3 650 subsiste, mais la vallée à 3341 a disparu, laissant simplement une légère dépression.

Les deux spectres (fig. 3 et 4) sont très similaires. Ils coïncident en sept points ; aux autres points, l'écart est si réduit qu'on peut se demander s'il est significatif. Tout au plus peut-on se dire que la courbe du phage est un peu déplacée vers les

grandes longueurs d'onde. Il est à peu près certain que l'on a affaire au même chromophore dans les deux cas. Les faibles écarts entre les deux spectres sont peut-être dus à des modifica-

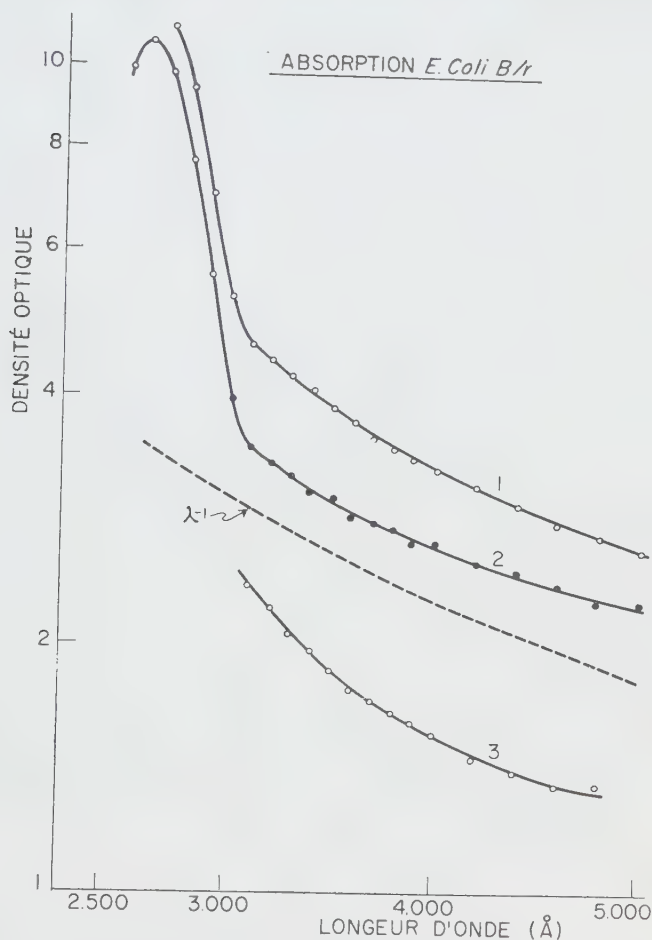


Fig. 5. — Spectres d'absorption d'*E. coli* B/r enregistrés avec un spectrophotomètre Beckman : (1) utilisation normale ; (2) cuvettes tournées à 90°, les faces dépolies étant sur le chemin optique ; (3) avec un écran de papier huilé.

tions d'opacité optique de la bactérie sous l'effet de l'infection par le phage.

Il est curieux que les deux vallées observées coïncident avec deux raies du mercure. Cette coïncidence est fortuite ou non.

1° Nous avons d'abord constaté qu'il ne s'agit pas d'un écart à la réciprocité dû à la plus grande intensité des raies ; en opérant avec les mêmes temps d'exposition pour les raies et les bandes voisines, on retrouve les vallées ; 2° en étudiant les trois bandes 3900, 4050 et 4200 avec la lampe au xénon, on obtient les mêmes résultats qu'avec la lampe à mercure, ce qui prouve que la raie 4047 du mercure (laquelle d'ailleurs n'entraîne pas de vallée) a la même efficacité que la bande de même longueur d'onde du xénon. (A cause de sa faible intensité, la lampe au xénon n'a pas pu être utilisée à 3650). La vallée à 3650 est donc bien réelle et significative d'une baisse de l'efficacité restauratrice ; d'ailleurs, Kelner [4] l'avait également observée. En revanche, l'existence de la vallée à 3341 est peut-être plus douteuse, puisqu'elle n'apparaît pas dans le spectre du phage.

La figure 5 montre le spectre d'absorption des bactéries B/r dans la région de la PR. La courbe 1, prise dans les conditions normales d'utilisation du spectrophotomètre Beckman DU, souffre de l'importance de la diffusion par les bactéries. Shibata et al. [13] ont éliminé en grande partie l'influence de la diffusion en disposant un bon diffuseur (verre dépoli, papier huilé) entre la préparation et le photo-récepteur. La courbe 2 fut obtenue en plaçant la cuve Beckman à 90° de sa position normale, les faces dépolies se trouvant ainsi dans le chemin optique. Enfin la courbe 3 fut obtenue après interposition d'un papier filtré imbibé d'huile de paraffine. Aucun accident spectral n'apparaît dans l'absorption entre 3100 et 4500, ni dans la courbe 1 (bonne résolution, mais forte diffusion), ni dans la courbe 3 (diffusion atténuée, mais faible résolution), mais on n'en peut tirer aucune conclusion quant aux accidents de la courbe de PR, car trop de diffusion persistait qui pouvait masquer semblables accidents dans l'absorption vraie. Il est toutefois plus probable que ces accidents se rapportent à un chromophore particulier, et ne sauraient donc apparaître dans le spectre d'absorption de la bactérie totale.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Pour inactiver avec des photons de 5 eV, 1 p. 100 de bactéries B/r, il faut une énergie incidente d'environ 10 ergs mm⁻². Pour restaurer, avec des photons de 3 à 4 eV, 1 p. 100 de bactéries B/r, il faut une énergie incidente de 40 000 ergs mm⁻² (1). Ce fait laisse entendre que si les nucléoprotéines sont des chromophores extraordinairement absorbants pour l'inactivation, il est

(1) Du fait que la courbe d'inactivation de B/r est à coups multiples, ce rapport des doses 1 p. 100, égal à 4 000, diffère du rapport des doses 63 p. 100, égal à 1 000 qu'il serait plus valable de considérer.

possible que la fonction chromophore de la PR absorbe faiblement les radiations restauratrices.

Il se peut donc que le spectre d'action restauratrice corresponde à la « queue » d'une courbe d'absorption dont le maximum se trouverait vers de plus courtes longueurs d'onde, dans un domaine où l'action létale prédominante masquerait la PR. Le fait que la PR demeure élevée, quand on se déplace vers les courtes longueurs d'onde jusqu'au moment où apparaît l'efficacité létale, est compatible avec l'idée que le chromophore serait porté par un acide nucléique ou par une protéine. Cette idée est également en accord avec le fait que l'efficacité restauratrice reste à peu près constante entre 3200 et 4200 Å, mises à part les deux petites vallées à 3340 et 3650 Å.

La grande complexité de la PR ressort bien : 1° du fait qu'aucune PR n'a pu être obtenue sur un constituant biologique isolé *in vitro* ; 2° du fait qu'elle ne consiste pas en une réaction photochimique simple, mais qu'elle comporte une phase sombre [18].

Kelner [4] a suggéré que le chromophore pour la PR chez *S. griseus* peut être une porphyrine ; les expériences de Bellamy et Germain [14] sur les streptocoques soutiennent cette idée. Mais Latarjet et Beljanski [15] ont montré que des mutants d'*E. coli* dépourvus de porphyrines sont aussi photorestaurables que les souches sauvages correspondantes, ce qui prouve que le chromophore chez *E. coli* n'est pas une porphyrine. De leur côté, Blum et al. [16] ont observé que le pigment principal (red echynochrome pigment) d'*Arbacia punctulata* n'est pas nécessaire à la PR.

Les courbes d'action (fig. 3 et 4) indiquent que le chromophore est le même dans le cas de la bactérie B/r (formation des colonies) et du complexe B/r — T2 (multiplication du phage irradié). Sur la base de spectres grossiers, Kelner [4] avait suggéré cette identité. La survie de B/r aux UV suit une courbe à deux coups [19], dans le premier logarithme de l'inactivation comme T2 [20]. La PR de la bactérie suit une courbe à 1,5 coup, celle de T2 une courbe à un coup (fig. 2). Si donc le chromophore est le même, les mécanismes diffèrent quelque peu. On a déjà observé une réaction sombre dans la PR du phage [18]. Le fait que la réciprocité entre temps et débit reste valable sur une étendue plus grande dans la PR des bactéries que dans celle des phages indique que la réaction sombre, qui doit entrer en jeu chez les bactéries également, est plus brève ou joue un rôle moindre que dans la PR des phages.

La concordance des deux spectres d'action témoigne en outre de la valeur de la technique utilisée. Le haut pouvoir de résolution du monochromateur, la grande pureté des bandes spectrales isolées ont révélé deux vallées étroites et des chutes abruptes aux extrémités du spectre. Elles ont permis de prouver que le chro-

mophore est le même dans les deux cas, mais n'ont pas permis de l'identifier. Les spectres de PR précédemment obtenus par d'autres auteurs ne révélaient pas de détails fins [47]. Nos spectres apportent des détails utiles à l'interprétation biochimique du phénomène, mais on doit reconnaître que leur valeur est encore limitée.

RÉSUMÉ.

Au moyen d'un appareillage suffisamment lumineux et à haut pouvoir de résolution, on a déterminé les spectres d'action de la photorestauration après irradiation UV de la bactérie *E. coli* B/r et du phage T2 chez B/r. Ces deux spectres sont approximativement superposables. La PR est à peu près constante entre 3200 et 4200 avec une vallée étroite à 3650 Å et une vallée de moindre importance à 3340 Å. La PR tombe brusquement de part et d'autre du spectre. Au maximum de PR, les doses incidentes de lumière qui restaurent 1 p. 100 des germes inactivés sont égales à 40 000 ergs mm⁻² pour la bactérie, et 15 000 ergs mm⁻² pour le phage. La nature du chromophore n'a pas été identifiée.

Nous sommes heureux de remercier M^{lle} Lieb, Messieurs H. Marcovich et H. Wihlm de leurs utiles conseils.

SUMMARY.

A double monochromator with high luminosity and high resolving power has been used for determining the action spectra of photorestauration after UV-irradiation in *E. coli* B/r and in its bacteriophage T2. The two spectra are almost identical. PR is nearly constant between 3200 and 4200 Å, with a narrow valley at 3650 Å and a valley of less importance at 3340 Å. PR falls abruptly on each side of the spectrum. At maximum PR the incident doses of light which restore 1 % of the inactivated units are equal to 40 000 ergs mm⁻² in the case of the bacterium, and 15 000 ergs mm⁻² in the case of the phage. The nature of the chromophore has not been identified.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KELNER (A.). *J. Gen. Physiol.*, 1951, **34**, 835.
- [2] DULBECCO (R.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 329.
- [3] HELMKE (R.). *Zbl. Bakt. Parasit.*, 1954, **161** (Abt. Orig.), 329.
- [4] STUY (J. H.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 206.
- [5] HARM (W.) et STEIN (W.). *Zeits. Naturforschung*, 1953, **8b**, 123.
- [6] LATARJET (R.) et CALDAS (L. R.). *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 455.

- [7] DULBECCO (R.). *Radiation Biology*, 1955, vol. II (ed. Hollaender-McGraw-Hill, N. Y.), 455.
- [8] ANDERSON (E. H.). *P. N. A. S.*, 1946, **32**, 120.
- [9] WIEHL (H.). *Revue d'Optique*, 1954, **33**, 425.
- [10] LATARJET (R.), MORENNE (P.) et BERGER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 174.
- [11] LOOFBOUROW (J. R.). *Growth Symposium*, 1948, **12**, 75.
- [12] HOLLAENDER (A.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 531.
- [13] SHIBATA (K.), BENSON (A. A.) et CALVIN (M.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1954, **15**, 461.
- [14] BELLAMY (W. D.), GERMAIN (M. T.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 351.
- [15] LATARJET (R.), BELJANSKI (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 127.
- [16] BLUM (H. F.), ROBINSON (J. C.), LOOS (G. M.). *J. Gen. Physiol.*, 1951, **35**, 323.
- [17] BLUM (H. F.). *Biophysical Research Methods*, 1950, 431 (ed. Uber-Interscience, N. Y.).
- [18] BOWEN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 218.
- [19] WITKIN (E. M.). *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1946, **32**, 59.
- [20] LATARJET (R.) et MORENNE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 220.

ÉTUDE MYCOLOGIQUE D'UNE HISTOPLASMOSE SPONTANÉE DU SINGE AFRICAIN (*CYNOCEPHALUS BABUIN*) (*)

par F. MARIAT et G. SEGRETAINE (**).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et de Physiologie végétale)

Nous avons précédemment décrit dans une courte note [1] une mycose spontanée observée pour la première fois chez des singes africains.

Depuis lors, de nouveaux cas sont apparus et il nous a été possible, après maintes difficultés, d'obtenir le champignon responsable en culture pure et de reproduire expérimentalement la maladie. On se propose, au cours de ce mémoire, de rappeler succinctement l'aspect clinique et anatomopathologique de cette mycose, de décrire les diverses caractéristiques du champignon responsable, enfin de rendre compte de son pouvoir pathogène expérimental (1).

★★

Notre observation porte maintenant sur cinq singes de l'espèce *Cynocephalus babuin*. Les animaux, trois mâles et deux femelles, qui ont spontanément présenté cette maladie fongique étaient âgés de 2 à 3 ans. Ils étaient tous originaires de la région de Kindia (Guinée française) et étaient maintenus en captivité à l'Institut Pasteur depuis dix-huit mois à deux ans. Les cynocéphales ne semblaient pas souffrir des lésions cutanées plus ou moins nombreuses dont ils étaient porteurs ; leur état général semblait

(*) Travail exposé au « 4th Informal Meeting of Workers in Medical and Veterinary Mycology », Cambridge, avril 1956.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

(1) Nous adressons nos plus vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'étude de cette histoplasmose chez le singe : le Dr Courtois qui nous a fait profiter de son observation originale, le Dr Levaditi et M^{me} Nazimoff qui ont effectué les examens anatomo-pathologiques, les Drs Lecanuet et Aussage à qui nous devons les examens radiologiques, MM. Grzelak, François et Simonnet qui ont réalisé les photographies, et le Dr Charlotte C. Campbell (Walter Reed Army Medical Center, Washington) qui a effectué pour nous les réactions sérologiques.

très satisfaisant. Pendant toute la durée de notre observation, un seul des animaux est mort. Il a succombé à une affection pulmonaire bactérienne. Les autres animaux ont été sacrifiés.

La *lésion élémentaire* se présente toujours comme une papule ou un nodule violacé à centre plus clair dont la taille varie de 4 à 10 mm. Cette lésion correspond à une masse dermo-hypodermique qui peut être petite et dure ou bien plus volumineuse et alors pseudo-fluctuante. Dans ce dernier cas, la peau amincie peut se perforer, et, par la fistule ainsi formée s'écoule un pus

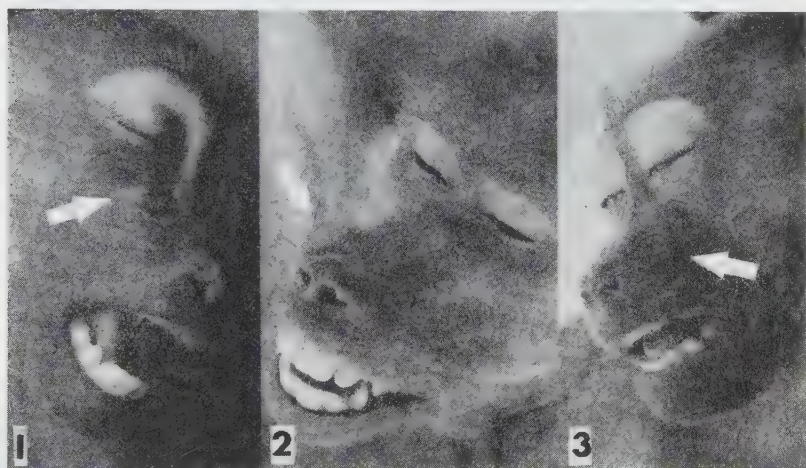


FIG. 1. — Lésions nodulaires sur le museau des cynocéphales : 1. Nodule très récent (singe n° 3). 2. Nodule atteignant la taille d'une grosse noix (singe n° 4). 3. Deux petits nodules peu développés (singe n° 2).

jaunâtre, crémeux. Des ulcérations planes arrondies ou allongées, de taille variable, sont parfois extrêmement étendues, constituant de vastes ulcères chroniques et correspondent à d'anciens nodules fistulisés (fig. 2, 3). Le fond de l'ulcération, bordé d'un bourrelet épidermique plus ou moins saillant, suppure peu et saigne facilement. Dans la région fessière, les nodules sont, soit isolés, soit nombreux et conglomérés (fig. 2, 2). On en trouve également sur le museau (fig. 1), tout le long de la queue et sur les membres (fig. 2). Les nodules de la queue sont fréquents et étendus, ils adhèrent aux ligaments et aux vertèbres et s'ulcèrent facilement.

L'examen radiologique d'un des animaux n'a pas permis de déceler d'atteinte pulmonaire. Les radiographies de la queue (fig. 3) donnent en revanche d'intéressantes précisions. La transparence des parties molles renflées est considérablement diminuée et peut

atteindre l'opacité de l'os. Au niveau des parties molles attaquées il y a atteinte concomitante des éléments du squelette. On note une ostéolyse pouvant aller jusqu'à la fracture spontanée, alors

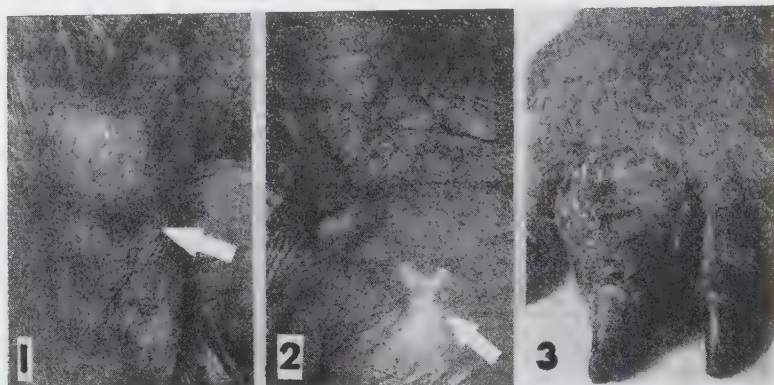


FIG. 2. — 1. Gros nodule sur la queue (diamètre ± 2 cm) flanqué d'un nodule plus petit. De tels nodules se rencontrent sur les deux tiers de la longueur de la queue. 2. Nodules conglomérés sur la fesse. Un des nodules est fistulisé. 3. Lésion ulcérée sur le médius (diamètre ± 3 cm). On peut comparer la taille du médius atteint à celle de l'annulaire.

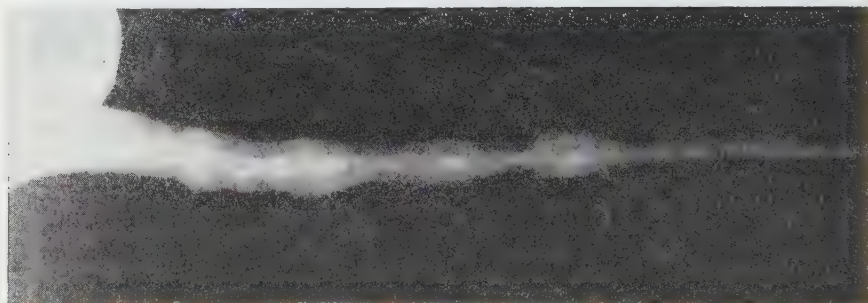


FIG. 3. — Radiographie de la queue d'un singe atteint d'histoplasmose. Les nodules sous-cutanés se signalent par une opacification des tissus. Au niveau des nodules les éléments du squelette sont lésés : on peut remarquer deux fractures spontanées.

que les articulations des vertèbres paraissent respectées. L'ostéolyse, également remarquée au cours des examens anatomopathologiques, est un fait signalé dans un cas humain d'histoplasmose [2].

L'autopsie des animaux ne décèle aucune atteinte viscérale

notable pouvant être rapprochée des lésions dermiques. Le foie de deux des singes présente quelques rares points de rétraction. Dans deux cas la rate porte une protubérance, fait fréquent chez les cynocéphales filariens et sans rapport avec la maladie. Les ganglions axillaires et inguinaux sont le plus souvent de taille normale ou subnormale. Chez l'un des singes un ganglion axillaire est nettement hypertrophié. Les ganglions médiastinaux sont normaux.

L'examen *anatomo-pathologique* des prélèvements biopsiques ou nécroscopiques au niveau des lésions montre toujours une image de granulome à corps étranger, peu vascularisé, constitué de nombreux plasmodes bourrés de formes levures arrondies ou ovalaires qui refoulent les noyaux à la périphérie. Le nodule peut se situer dans l'hypoderme et laisser le derme et l'épiderme inaltérés. Il peut également intéresser le derme sous un épiderme atrophique ou ulcéré. Le nodule est presque toujours entouré d'une fibrose importante qui peut diviser la tumeur en éléments multiples. Entre les plasmodes il existe une infiltration séreuse ou séro-fibrineuse contenant d'assez nombreux polynucléaires. Ceux-ci pénètrent parfois les plasmodes et réalisent alors des zones de nécrose purulente où les levures sont à l'état libre et souvent en chaînettes. On constate également la présence d'une trame collagène qui encercle plasmodes et macrophages (planche II, fig. 2).

Les cellules fongiques à l'intérieur des plasmodes mesurent environ $8 \times 7 \mu$. Certaines peuvent atteindre des dimensions plus grandes ($13 \times 10 \mu$). Les éléments levuriformes, bourgeonnants, limités par une membrane épaisse se colorent avec difficulté. La technique à l'acide periodique Schiff ne colore qu'un faible pourcentage d'éléments. La technique histologique qui dans nos essais a donné le meilleur résultat est l'imprégnation argentique de Bielschowsky-Perdreau destinée à mettre en évidence la réticuline. Malgré leur faible affinité pour les colorants, la grande taille et la réfringence des éléments fongiques permettent de les voir aisément dans les coupes des lésions.

Les parasites ne sont décelés que dans les lésions cutanées et dans les ganglions axillaires et inguinaux. Il n'a jamais été possible de les voir dans les viscères, bien que les tissus de rate et de foie en particulier soient parfois très remaniés.

Le pus ponctionné dans les nodules contient en abondance des levures, le plus souvent ellipsoïdes, mesurant en moyenne $8,2 \times 6,9 \mu$ (planche II, fig. 1, 3, 4). Les cellules fongiques sont isolées ou groupées en chaînettes de deux, trois, quatre ou même cinq éléments unis entre eux par leur grand axe. Les levures sont limitées par une membrane épaisse, à double contour, qui semble

parfois s'exfolier. A l'intérieur des levures se trouvent des inclusions graisseuses sphériques, uniques ou multiples. Lorsqu'un élément levuriforme bourgeonne, le bourgeon est limité par une membrane mince; il est relié à la cellule mère par un isthme large et s'en sépare par une membrane (fig. 4).

Le champignon dans les lésions et dans le pus, bien que pouvant être éventuellement confondu avec *Blastomyces dermatitidis*, rappelle très exactement le parasite observé dans les différents cas d'histoplasmosse dite « à grandes formes ».

Chez quatre des singes nous avons tenté de poser un diagnostic de la maladie par l'emploi de deux des antigènes fongiques fabriqués au laboratoire de Mycologie de l'Institut Pas-

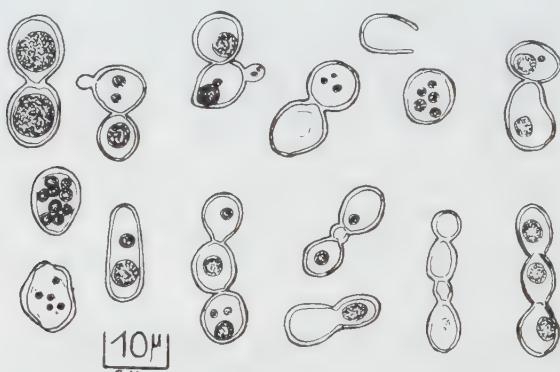


FIG. 4. — Divers aspects de cellules levures rencontrés dans le pus. On peut remarquer à l'intérieur les inclusions graisseuses uniques ou multiples.

teur (histoplasmine polyvalente diluée ou non diluée, blastomycétine). Ces essais n'ont donné aucun résultat positif. On peut supposer que cette absence de réaction était due au fait que les singes inférieurs sont connus pour ne pas donner de réponse allergique. L'injection intradermique à deux des singes de filtrat de culture du champignon qui est cause de la maladie n'a pas donné non plus de réaction cutanée.

La réaction de déviation du complément pratiquée dans le laboratoire où cette technique a été mise au point pour l'histoplasmosse [3] n'a pas donné de résultats utilisables pour le diagnostic. Le sérum de l'un des deux singes était, comme celui du témoin, anticomplémentaire; le sérum du second singe a donné les titres de 1/32 avec l'antigène d'*Histoplasma capsulatum* (phases levure et mycélienne) et de 1/64 avec l'antigène de *Blastomyces dermatitidis* (phase levure).



Nous avons éprouvé les plus grandes difficultés pour obtenir la culture du *champignon* dont les éléments sont pourtant si nombreux dans les lésions et dans le pus.

Lors de notre premier essai de culture, malgré l'ensemencement d'un grand nombre de tubes (environ 200), des divers milieux utilisés au laboratoire pour l'isolement des champignons et malgré la richesse en éléments fongiques du pus ou des fragments de lésions ensemencés, nous n'avions obtenu, deux mois et demi après l'ensemencement, aucune culture du parasite. Au troisième mois nous avons vu apparaître, mais seulement dans quelques rares tubes, un début de culture de la taille d'une tête d'épingle. Cette microcolonie ne se développait que très lentement. Aucun des milieux utilisés ne semblait être particulièrement favorable ; les colonies étaient observées sur les milieux les plus communs (gélose Sabouraud glucosée et moût de bière, incubés à 30°).

Macroscopiquement, les microcultures obtenues étaient mamelonnées et brunes ; microscopiquement elles étaient constituées d'hyphes très irrégulières, vésiculées. Certaines des vésicules terminales ou intercalaires présentaient un double contour et rappelaient des chlamydo-spores lisses. L'image était éloignée de celle de l'*Histoplasma* que nous espérions. Cependant aucun doute n'était permis, ces cultures étaient bien celles du parasite puisqu'on voyait, dans les examens microscopiques, des cellules levures donner naissance à des filaments vésiculeux.

Six mois ont été nécessaires à partir du repiquage des primocultures pour enfin obtenir une morphologie présentant d'assez étroits rapports avec l'*Histoplasma*. Cette morphologie a notamment été observée sur le milieu à la pomme de terre glycinée.

A chaque essai de culture à partir des produits pathologiques, les résultats sont semblables. La richesse de l'inoculum en éléments fongiques est toujours élevée ; la proportion de cultures positives est toujours très faible ; le développement des colonies est toujours extrêmement lent. Au moment de l'autopsie des différents singes, tous les organes ont été mis en culture. Nous avons obtenu deux cultures positives à partir de fragments de la rate d'un des animaux. Malheureusement la rate était macroscopiquement normale et nous n'avons jamais décelé de parasites à l'examen microscopique. De ce fait, il ne nous est pas possible d'affirmer, bien que nous le pensions fermement, que la rate était parasitée. Bien que toutes les précautions nécessaires aient été prises lors de l'autopsie, on peut évidemment supposer que les deux fragments de rate étaient accidentellement contaminés par les ganglions prélevés juste avant et qui, eux, contenaient le

champignon. Aucun autre organe n'a donné de rétrocultures positives.

L'entretien en culture des souches obtenues est également difficile. Il est nécessaire d'ensemencer un gros inoculum et il faut patienter au moins un mois pour le voir commencer à se développer. Nous possédons cependant maintenant bon nombre de cultures. Les examens macroscopiques et microscopiques pratiqués à de nombreuses reprises nous autorisent à donner maintenant les caractéristiques de cette souche intéressante (planche I).

*
**

Si l'on fait la synthèse des observations effectuées sur les différents milieux, le champignon isolé du singe présente microscopiquement les caractères suivants.

Le *filament* de 1 à 2 μ de diamètre est cloisonné par des septums plus ou moins rapprochés. Il peut être de forme régulière comme c'est le cas par exemple sur le milieu à la pomme de terre glycinée. Il peut, au contraire, être gonflé de nombreuses vésicules (planche I, fig. 1). Ces dernières peuvent être très proches les unes des autres ; leur diamètre varie de 3 à 8 μ . La membrane du mycélium est mince et celle de quelques-unes des vésicules peut être épaissie. Les divers colorants utilisés teintent difficilement le mycélium.

Les *chlamydospores* sont en général sphériques mais quelques-unes sont piriformes. Leur diamètre varie de 6 à 12 μ . La membrane des chlamydospores est épaisse et sa surface est souvent lisse. Sur certains milieux les chlamydospores sont finement échinulées (planche I, fig. 3 ; planche II, fig. 5). Elles portent des ornements comparables à celles qui caractérisent l'espèce *Histoplasma capsulatum*. Cependant les ornements n'atteignent jamais la taille de ceux observés sur les chlamydospores des souches types d'*H. capsulatum*. En présence de glycérine dans un milieu le pourcentage des chlamydospores échinulées est élevé (planche I, fig. 2).

Pendant longtemps nous n'avons pas noté la présence de *microspores*. Dernièrement, sur milieu au moût de bière gélosé, nous avons observé quelques microspores sessiles ou courtement pédiculées dont le diamètre varie de 2 à 4 μ (planche I, fig. 5).

L'examen microscopique des cultures est gêné par des gouttelettes d'une substance grasse synthétisée en abondance par le champignon.

Si la forme levure, parasitaire des différents *Histoplasma capsulatum* est aisément obtenue *in vitro* [4], il n'en va pas de même pour notre souche. Nous avons constamment essayé d'obtenir la phase levure du champignon en cultivant celui-ci à partir de pus

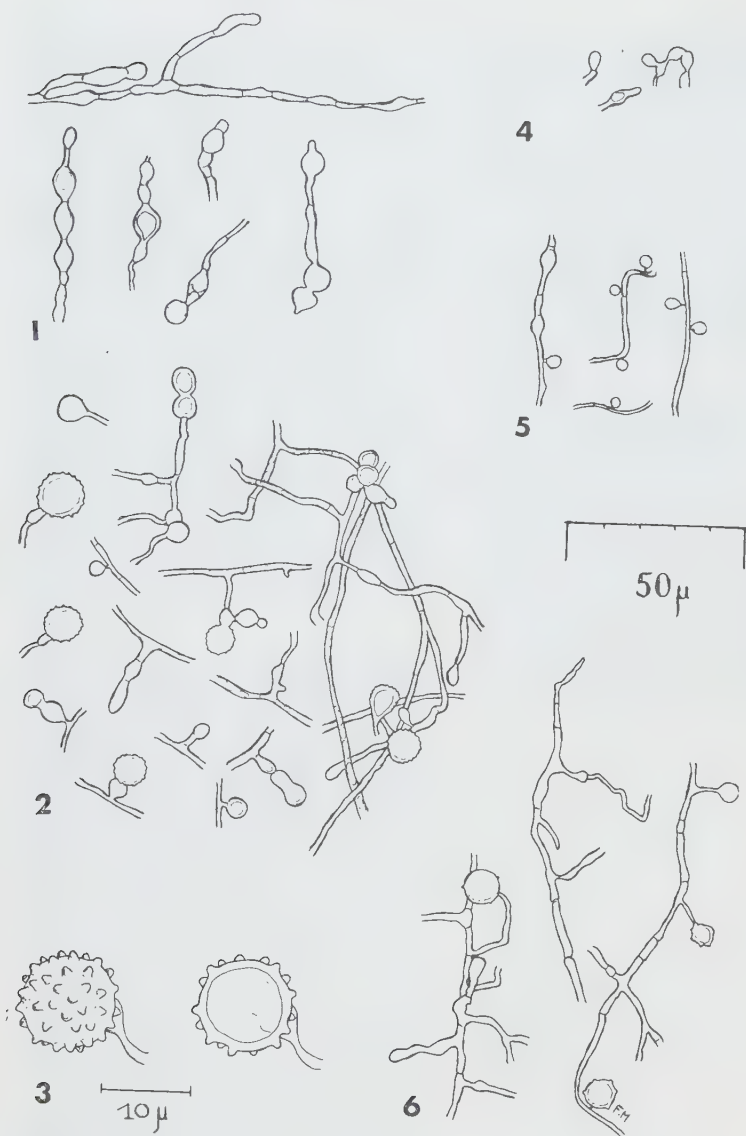


PLANCHE I. — Divers aspects du champignon en culture : 1. Filaments moniliformes et vésiculeux (milieu pomme de terre-carotte). 2. Filaments et chlamydospores sur milieu à la pomme de terre glycinée. 3. Grande chlamydospore échinulée montrant la petite taille des ornements. 4. Filament mal développé, moniliforme (gélose de Sabouraud maltosée). 5. Microspores (milieu au moût de bière gélosé). 6. Mycélium portant quelques chlamydospores (gélose ordinaire).

ou de fragments de colonies, dans les conditions favorables à la formation de cette phase parasitaire (milieu de Kurung, milieu au sang à 37°).

Nos essais ont été infructueux jusqu'à ces derniers temps. Tout dernièrement en effet, l'examen d'une colonie résultant de plusieurs transferts sur milieu de Kurung à 37° (inoculum initial : fragment de culture filamenteux) a montré quelques formes levures bourgeonnantes de grande taille ($\pm 8 \mu$). Bien que les éléments levuriformes observés soient rares, il est permis d'espérer que de nouveaux transferts nous permettront d'obtenir enfin une colonie composée uniquement de levures.

Les *caractères cultureux* du champignon sont différents d'un milieu à l'autre. Les aspects décrits ci-dessous sont observés deux mois et demi après l'ensemencement d'un fragment de culture d'environ 4 x 4 mm, les tubes étant incubés à 30°. Sur *gélose Sabouraud glucosée*, la colonie est gris brun à base mamelonnée surmontée de lamelles dressées. Fréquemment on note la présence de formations de 2 à 4 mm de diamètre rappelant des pézizes ou des géasters. Ces formations semblent à l'origine de l'aspect lamellaire de la colonie. En quelques points il y a présence de duvet blanchâtre. L'addition de vitamines à ce milieu ne modifie aucunement l'allure du développement ni la morphologie du champignon.

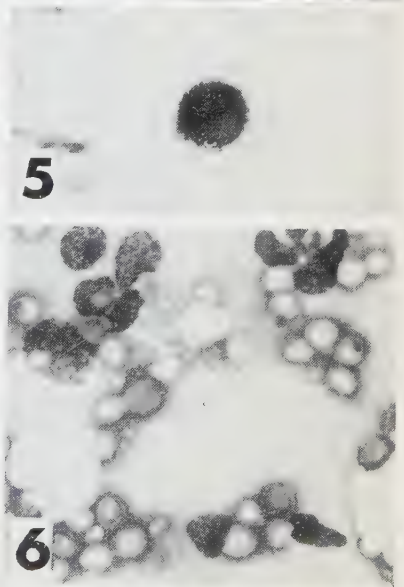
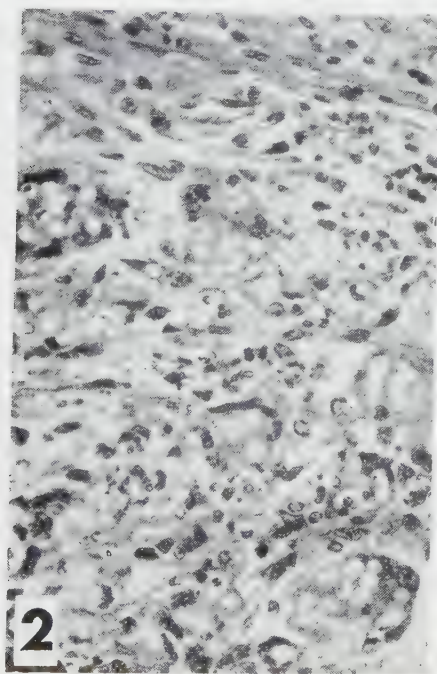
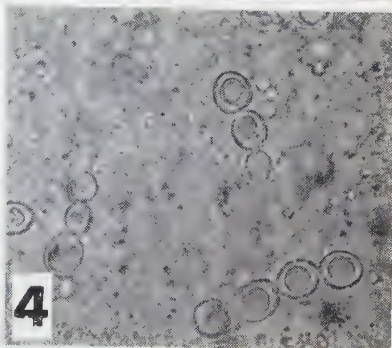
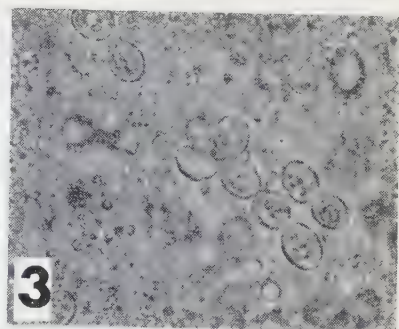
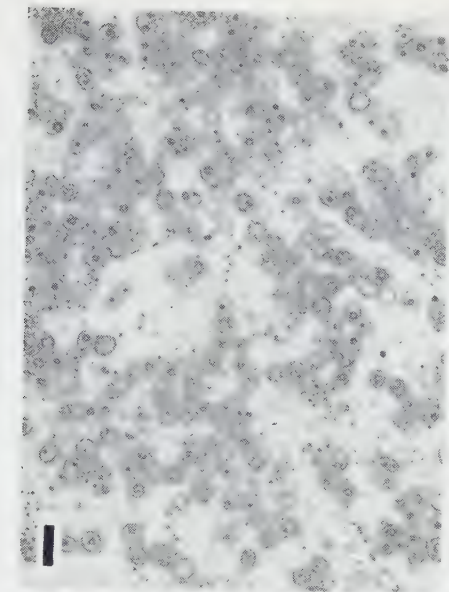
Sur *gélose Sabouraud maltosée*, le développement est plus réduit que sur *gélose glucosée*. Les colonies sont cérébriformes, de couleur grise et elles sont recouvertes sur les deux tiers de leur surface d'un duvet blanchâtre. Sur *gélose Sabouraud non sucrée*, le développement du champignon est faible.

Le *milieu au moût de bière gélosé* permet d'obtenir des colonies bien développées. Elles sont mamelonnées, comme composées d'éléments sphériques juxtaposés. Certaines cultures présentent des touffes de spicules. Elles sont blanc grisâtre, et parfois recouvertes de duvet blanchâtre.

La colonie sur *gélose ordinaire* (bouillon de viande peptoné et gélosé) est à centre cérébriforme, à bords peu élevés. La couleur est jaunâtre givré de blanc.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

1. Goutte de pus observée au microscope à contraste de phase. On remarque la richesse du pus en éléments levures ($\times 380$). 2. Coupe dans un nodule sous-cutané montrant les nombreux plasmodes bourrés de levures coloration trichromique ($\times 350$). 3, 4. Cellules levures bourgeonnantes dans le pus ; la membrane à double contour et les inclusions graisseuses sont bien visibles ($\times 750$). 5. Chlamydospore échinulée obtenue sur pomme de terre glycinée (Hotchkiss Mac Manus $\times 930$). 6. Frottis de pus prélevé dans le testicule d'un cobaye inoculé avec du pus de singe (Giemsa $\times 670$).





Le milieu *pommes de terre glycinées gélifié* permet un bon développement. Les colonies sont mamelonnées, entièrement recouvertes de pulvérulence blanche ne laissant pas voir la couleur propre de la colonie. Le revers de la culture est brun foncé.

Sur un milieu *cerveau-cœur-sang* les colonies sont mamelonnées ou cérébriformes, lisses et de couleur brune ; sur milieu de Kurung (à 37°), la culture est lisse, humide, légèrement bombée, mamelonnée et de couleur jaune sale.

Dans les différents milieux liquides essayés, le développement est toujours très lent. Même lorsqu'ils sont agités, les milieux liquides sont moins favorables à la croissance du champignon que les milieux solides.

La physiologie de cet organisme n'est que peu étudiée jusqu'à présent. Un point remarquable est la lenteur extrême du développement. Les vitamines du groupe B, seules ou en mélange, ajoutées à des milieux complexes ou chimiquement définis, liquides ou gélifiés, sont incapables de stimuler ce développement.

Des essais montrent que, en présence d'asparagine à 1 p. 1 000 comme source d'azote et sur milieu synthétique (KH_2PO_4 : 0,36 g ; Na_2HPO_4 , 12 H_2O : 1,42 g ; MgSO_4 , 7 H_2O : 0,60 g ; KCl : 1,00 g, oligoéléments, vitamines du groupe B, eau : 1 000 g), le glucose (1 p. 100) est l'aliment carboné le mieux utilisé ; la glycérine (1 p. 100) permet également une bonne croissance et est particulièrement favorable à la formation de duvet blanc et de chlamydospores échinulées. Le saccharose est faiblement utilisé et le maltose moins encore. Le lactose et l'amidon, tout comme les milieux témoins sans sucre, ne permettent aucun développement. Sur le même milieu synthétique mais en remplaçant l'asparagine par du glucose à 1 p. 100, on étudie l'alimentation azotée. Les composés employés (0,5 g d'azote par litre) montrent que l'asparagine et le phosphate biammoniacal sont bien utilisés et donnent de bons développements. Bien que moins favorables, l'hydrolysât de caséine et la peptone (Chapoteau) sont également bien utilisés. Le sulfate d'ammonium ne permet d'obtenir qu'une croissance médiocre et le nitrate de potassium est à peine utilisé.



La *maladie expérimentale* a été reproduite avec beaucoup de difficultés. Comme l'évolution de la maladie spontanée le démontre déjà, le champignon isolé du singe est assez peu pathogène. Nous n'avons jamais obtenu de mortalité chez les divers animaux inoculés, même en injectant des quantités relativement élevées de champignon.

Le résultat le plus net a été obtenu avec le *singe*. Nous avons inoculé à un jeune cynocéphale mâle, en deux points (queue et

fesse), la valeur de 0,5 cm³ de pus par voie sous-cutanée. Le pus provenait de l'abcès fermé d'un singe atteint spontanément. Environ trois mois après l'inoculation, des lésions apparaissent au lieu de l'injection. Elles sont, dix mois après l'inoculation, exactement comparables aux lésions observées au cours de la maladie spontanée. Ces lésions siègent sur la queue et sur les fesses, certaines sont ulcérées ; elles ne s'étendent que lentement. L'état général de l'animal sans être mauvais n'est cependant pas parfait. Un an après l'inoculation l'animal est mort d'une complication pulmonaire intercurrente. Une réaction de fixation du complément (Dr C. Campbell) a permis d'obtenir un titre de 1/32 avec l'antigène de *Blastomyces dermatitidis* (phase levure) et un titre nul avec les antigènes d'*Histoplasma capsulatum* (phases levure et filamenteuse) et avec la coccidioidine. De même un test d'agglutination du collodion sensibilisé par l'histoplasmine a été négatif.

L'injection intradermique à ce singe des antigènes suivants : histoplasmine au 1/100, blastomycétine au 1/100, filtrat de culture du champignon du singe n'a donné aucun résultat positif. L'autopsie de ce singe ne révèle aucun caractère permettant d'attribuer une atteinte des viscères par le champignon. Seuls les poumons présentent une intense réaction pneumonique.

L'inoculation au *cobaye*, par voie intratesticulaire de 0,2 et 0,4 cm³ de pus ponctionné dans un abcès du singe, a provoqué une orchite du côté inoculé, palpable dès le troisième mois et qui n'affectait nullement l'état général.

Deux des animaux sont sacrifiés six et neuf mois après l'inoculation. L'orchite mise à part aucun aspect pathologique ne peut être remarqué. Les frottis et les coupes permettent de voir que le testicule atteint est bourré de plasmodies contenant une forme levure exactement semblable à celle de la maladie spontanée chez le singe (planche II, fig. 6). Une mise en culture de fragments de testicules permet d'obtenir en deux mois le développement du champignon responsable. La rate paraît tout à fait normale chez les deux animaux sacrifiés. Pourtant l'ensemencement de fragments de la rate du cobaye sacrifié six mois après l'inoculation donne, sur milieu au sang, des cultures visibles en trois mois et demi. L'examen des coupes de cette rate colorées par diverses techniques (dont la technique de Hotchkiss) ne révèle pas la présence de parasites. L'examen de tous les autres organes et leurs rétrocultures sont négatifs.

Quatorze mois après l'inoculation les cobayes conservés semblent en bonne santé. Ils sont porteurs d'une orchite unilatérale volumineuse (longueur 5 cm, largeur 3 cm). L'injection intradermique pratiquée à plusieurs reprises au cours des quatorze mois, qu'il s'agisse d'histoplasmine diluée ou non diluée, de blastomy-

cétine au 1/100 ou de filtrats de culture du champignon du singe, n'a donné aucune réaction positive.

Le *hamster* qui s'est pourtant révélé un excellent animal de laboratoire pour l'étude des mycoses en général [5, 6] et de l'histoplasmose en particulier [43, 7] n'a pas, dans le cas présent, permis d'obtenir de bons résultats. L'inoculation sous-cutanée de broyats de cultures provoque chez l'un des animaux l'apparition, au point d'inoculation, d'un abcès de la taille d'un pois. A l'autopsie, trois semaines après l'inoculation, on note la présence à ce même point de petits abcès dont le pus contient des filaments très vésiculeux, modification probable de l'inoculum même. Tous les autres organes sont intacts, aucune rétroculture n'est positive.

L'inoculation du champignon par voie intrapéritonéale (0,5 cm³), par voie intratesticulaire (0,2 cm³) ne donne aucun résultat. Les animaux non sacrifiés sont en excellente santé onze mois après l'inoculation. L'injection de 0,5 cm³ de pus par voie intrapéritonéale ne donne pas de meilleurs résultats. Les animaux non sacrifiés sont toujours en excellente santé quinze mois après l'inoculation. Aucune observation notable n'est faite lors de l'autopsie des animaux sacrifiés, aucune culture n'est obtenue.

Chez la *souris blanche* inoculée par voie sous-cutanée avec la culture du champignon (0,2 cm³), on note l'apparition de nodules au point d'inoculation avec à l'intérieur du nodule de grandes formes levures.

Si l'on inocule des souris par voie intrapéritonéale (0,5 cm³ de broyat de culture) et que l'on sacrifie les animaux après huit jours, on remarque la présence d'abcès de la taille d'une tête d'épingle, au point d'inoculation, sur le diaphragme et sur le foie. L'examen des coupes d'organes montre l'existence dans le foie, l'épiploon et sur le péritoine de petits nodules inflammatoires avec des formes levures de la même taille que celles qui sont observées dans le singe.

Les animaux sacrifiés après quinze jours ne montrent rien de particulier. Les souris sacrifiées après vingt-cinq jours ne portent que quelques nodules blanchâtres sur le péritoine, nodules qui ne contiennent pas de levures.

Dans tous les cas les rétrocultures sont négatives.

L'inoculation par voie veineuse de 0,3 cm³ de broyat de culture filtré sur gaze ne donne rien de remarquable chez les animaux sacrifiés dix et vingt-cinq jours après l'inoculation. L'expérience se poursuit actuellement.

CONCLUSION.

L'aspect des lésions observées chez les singes, leur histologie, la morphologie caractéristique du champignon *in vivo*, sa locali-

sation intracellulaire nous avaient fait conclure avant même que d'obtenir le parasite en culture que nous nous trouvions en présence d'une histoplasmosé dite « à grandes formes ». Les caractères du champignon confirment ce point de vue.

Il existe trois types reconnus d'histoplasmosé. Tout d'abord l'histoplasmosé classique ou maladie de Darling que l'on rencontre plus spécialement en Amérique, mais qui est signalée dans d'autres parties du monde notamment en Afrique [8, 9, 10]. Elle est caractérisée par la présence dans les cellules du système réticulo-endothélial d'éléments levuriformes de 1 à 4 μ de diamètre. Le champignon cultivé pour la première fois par Hansmann et Schencken [11, 12] et par de Monbreun [13] se présente *in vitro* sous la forme d'un mycélium cloisonné donnant naissance en plus ou moins grand nombre à des chlamydo-spores sphériques ou piriformes, tuberculées ou lisses de 7,5 à 15 μ de diamètre et à de petites spores de 2,5 à 3 μ de diamètre. C'est l'*Histoplasma capsulatum* classique.

Le second type d'histoplasmosé est décrit pour la première fois par Catanei et Kervran [14]. Il a été signalé auparavant mais on ignorait ce dont il s'agissait [15, 16]. C'est une maladie le plus souvent cutanée et chronique [14, 17, 18, 19, 20] mais pouvant également affecter les ganglions [21] et les organes profonds [22, 23]. La majorité des cas rencontrés sont africains, cependant il semble qu'il existe également quelques cas américains peut-être discutables [24, 25, 26, 27]. Cette histoplasmosé est caractérisée par la présence dans les lésions ou dans le pus de grandes formes levures à double contour pouvant atteindre de 8 à 13 μ . La mise en culture de ces levures donne une colonie mycélienne en tous points comparable à l'*Histoplasma capsulatum* isolé du type précédent : mycélium cloisonné, chlamydo-spores tuberculées, micro-spores. Vanbreuseghem [21] a créé pour le champignon responsable de cette histoplasmosé « à grandes formes » l'espèce *Histoplasma duboisi*.

Il existe enfin un troisième type d'histoplasmosé nettement particulier, connu sous le nom de lymphangite épizootique des équidés et qui a été bien étudié par Boquet et Nègre et cultivé la première fois par ces auteurs [28, 29, 30]. Dans les lésions le parasite se présente sous forme d'éléments ovalaires, bourgeonnants, de 2,5 à 3,5 μ de long sur 2 à 3 μ de large. En culture ce champignon (*Histoplasma farciminosum*) produit un mycélium cloisonné, des microspores et des chlamydo-spores exclusivement lisses. La culture d'*H. farciminosum* est difficile à obtenir alors que celle des deux premiers histoplasmes mentionnés plus haut est aisée.

La maladie observée chez le singe appartient, comme nous l'avons écrit, au second type d'histoplasmosé, cependant quelques

caractères tendent à l'en éloigner. Ce sont surtout les caractéristiques particulières des souches du singe et en tout premier lieu la difficulté extrême de culture et la morphologie macroscopique particulière des colonies. Ces derniers faits tendraient plutôt à rapprocher ce champignon d'*H. farciminosum* dont la culture est cependant plus rapide. Il faut également mentionner la grande rareté des microspores, la finesse des ornementsations des chlamydospores et la difficulté d'obtenir la phase levure *in vitro*. Par ailleurs, *in vivo*, en inoculant des animaux avec les souches isolées d'histoplasmoses humaines à grandes formes, on a obtenu plusieurs fois [17, 31, 32, 33] des petites formes du champignon. Nous n'avons jusqu'à présent jamais observé de fait semblable avec les souches du singe.

Il est évident que les deux champignons isolés de la maladie de Darling et de l'histoplasmose à grandes formes sont à tout le moins extrêmement voisins, comme sont voisines les maladies elles-mêmes [34]. C'est sans doute ce qui est cause des discussions passionnées autour du problème de leur taxonomie [35]. Certains mycologues, avec Vanbreuseghem qui défend énergiquement sa thèse [36], pensent qu'il y a lieu d'accepter l'espèce *H. duboisi* comme une bonne espèce. Vanbreuseghem base essentiellement le diagnostic de cette nouvelle espèce sur l'aspect particulier du champignon dans les tissus ainsi que sur la forme parfaitement sphérique des chlamydospores. D'autres soutiennent au contraire que le champignon des histoplasmoses à « grandes formes » est simplement un *H. capsulatum*. Ils se réfèrent pour ce faire à la quasi-similitude des aspects saprophytiques des deux champignons. D'autres enfin, et nous nous rangeons parmi ceux-ci, reconnaissent les différences réelles de morphologie parasitaire entre les deux *Histoplasma*, mais devant l'identité des morphologies saprophytiques proposent de considérer le champignon des histoplasmoses à grandes formes comme une variété ou une sous-espèce de l'espèce *H. capsulatum*. Il faut ajouter que des souches d'*Histoplasma capsulatum* isolées des deux différents types d'histoplasmoses donnent aisément la forme levure *in vitro* et qu'avec toutes les souches on obtient à la fois des grandes et des petites levures, seul le pourcentage varie avec la souche [32].

Il semble également qu'il existe un lien, une évolution entre les petites formes et les grandes formes d'*Histoplasma capsulatum*. Les étapes de cette évolution sont encore à préciser, mais il faut souligner l'existence de formes évolutives signalées à plusieurs reprises dans des histoplasmoses spontanées ou expérimentales [12, 24, 25, 26, 27, 32, 37, 38, 44]. Ces formes évolutives ne sont plus des petites formes ; ce ne sont pas non plus exactement des grandes formes *duboisi*. Schwarz a obtenu l'évolution de petites formes vers les grandes formes évolutives, *in vitro* dans

des fragments d'organes humains et animaux [39]. Dubois et Vanbreuseghem ont observé également le passage de la petite forme à la grande forme *duboisii* mais *in vivo* dans des testicules de cobaye [33].

C'est à notre avis répondre à la louable tendance actuelle, qui vise à regrouper les entités dispersées inutilement, que de conserver une seule grande espèce *Histoplasma capsulatum* (mycélium cloisonné, microspores, chlamydospores tuberculées ou échinulées, aptitude à provoquer une maladie chez l'homme ou l'animal). Au sein de cette grande espèce peuvent être groupées des variétés (ou sous-espèces) différant de l'espèce type par des caractères secondaires (par exemple *Histoplasma capsulatum duboisii* différant de l'espèce type par son aspect parasitaire).

La souche isolée du singe peut, quant à elle, soit constituer une variété d'*H. capsulatum* en admettant qu'elle conserve des caractères distinctifs suffisamment nets, soit être classée dans la variété *duboisii*. Nous attendons que les caractères de cette souche à développement extrêmement lent soient définitivement fixés pour prendre une décision finale.

Il nous faut également souligner que c'est la première fois qu'on signale une histoplasmose à grandes formes, spontanée chez les animaux où l'histoplasmose classique est assez fréquente [40]. Par ailleurs, si plusieurs auteurs ont utilisé des singes pour reproduire expérimentalement l'histoplasmose [13, 22, 41], c'est la première observation concernant une histoplasmose spontanée du singe et, précisons, du singe africain. Il n'est pas impossible que cet animal intervienne dans l'épidémiologie de l'histoplasmose en Afrique où cette maladie est sûrement plus fréquente qu'on ne le soupçonne [42].

RÉSUMÉ.

1° Une histoplasmose cutanée, chronique, est observée pour la première fois chez le singe africain du genre *Cynocephalus*. Cinq singes sont spontanément atteints.

2° Dans les lésions et dans le pus on trouve uniquement la grande forme parasitaire de l'*Histoplasma* : levures bourgeonnantes de $\pm 8 \times 7 \mu$. Dans les lésions les éléments fongiques sont intracellulaires.

3° Les morphologies macroscopiques et microscopiques du champignon sont décrites. On note en particulier la présence de chlamydospores échinulées.

4° Quelques caractères physiologiques sont donnés. On insiste sur la difficulté extrême de la culture et sur la lenteur du déve-

loppement. Aucun des produits essayés pour stimuler le développement ne donne satisfaction.

5° Le pouvoir pathogène du champignon est faible. Il est éprouvé sur le singe, le cobaye, le hamster, la souris. Aucune mortalité n'est enregistrée. La maladie est reproduite chez le singe. Le cobaye inoculé par voie intratesticulaire présente une orchite.

6° A propos de la classification du champignon isolé du singe, le problème de la taxonomie des *Histoplasma* est discuté. On propose, étant données les connaissances actuelles, que l'espèce *Histoplasma capsulatum* groupe des variétés (ou sous-espèces) différant de l'espèce type par des caractères secondaires.

7° En conclusion, les caractéristiques actuelles du champignon risquant de se modifier en culture, on le classe au moins provisoirement dans l'espèce *H. capsulatum*. Lorsqu'un certain recul aura permis d'enregistrer ses caractères définitifs, on se réserve la possibilité de la placer dans la variété ou sous-espèce *H. capsulatum duboisi* ou de créer une variété nouvelle.

SUMMARY.

1° A cutaneous, chronic, histoplasmosis is observed for the first time on African monkeys. Five cases are studied.

2° In the lesions and the pus only the large parasitic form of *Histoplasma* is found. In the lesions the fungus is intracellular.

3° The macroscopic and microscopic aspects of the fungus in culture are described. Echinulate chlamydospores are observed.

4° Few physiological properties are given. The great difficulty of culture and the slow development of the fungus are specially pointed out. None of the compounds tried enhance the development.

5° The pathogenicity of the fungus is slight. Monkeys, guinea-pigs, hamsters and mice are used in the experiments. The disease is reproduced in the monkey. Guinea-pigs showed orchitis after intratesticular inoculation.

6° The taxonomic problem about the fungi causing histoplasmosis is discussed. A single large species, *Histoplasma capsulatum* is recommended. Entities varying from the type species by secondary characteristics could be accepted as varieties (or sub-species).

7° While waiting for further information it seems more correct to class the monkey strains in the large species *H. capsulatum*. When definitive characteristics are fixed it will be possible to class this fungus in the variety (or sub-species) *H. capsulatum duboisi* or form a new variety.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COURTOIS (G.), SEGRETAI (G.), MARIAT (F.) et LEVADITI (J. C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 124.
- [2] FRIESS et DELVOYE. *Cahiers méd. Union Franç.*, 1947, **2**, 419.
- [3] CAMPBELL (C. C.) et BRINKLEY (G. E.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **42**, 896.
- [4] DROUHET (E.) et SCHWARZ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 144.
- [5] MARIAT (F.) et DROUHET (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 485.
- [6] SEGRETAI (G.) et DROUHET (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 593.
- [7] DUBOIS (A.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1953, **33**, 383.
- [8] SIMSON (F. W.) et BARNETSON (J.). *J. Path. Bact.*, 1942, **54**, 299.
- [9] JELIFFE (D. B.). *J. Trop. Med.*, 1949, **52**, 177.
- [10] LURIE (H. I.). *South Afric. Med. J.*, 1949, **23**, 180.
- [11] HANSMANN (G. H.) et SCHENCKEN (J. R.). *Science*, 1933, **77**, 8.
- [12] HANSMANN (G. H.) et SCHENCKEN (J. R.). *Amer. J. Path.*, 1934, **40**, 731.
- [13] MONBREUN (W. A. DE). *Amer. J. Trop. Med.*, 1934, **14**, 93.
- [14] CATANEI (A.) et KERVAN (P.). *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1945, **23**, 169.
- [15] LECÈNE in BRUMPT (E.). *Précis de Parasitologie*, 5^e éd. Masson, édit., Paris, 1936, p. 1787.
- [16] BLANCHARD (M.) et LEFROU (G.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1922, **15**, 915.
- [17] DUNCAN (J. T.). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1946, **40**, 364.
- [18] CLARKE (G. H. V.), WALKER (J.) et WINSTON (R. M.). *J. trop. Med.*, 1953, **56**, 277.
- [19] AUDEBAUD (G.), MERVEILLE (P.), LALLUQUE (P.) et DEPOUX (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 803.
- [20] SILVERA (W. D.) et KONSTAM (P. G.). *West African Med. J.*, 1954, **3**, 32.
- [21] DUBOIS (A.), JANSSENS (P. G.), BRUTSAERT (P.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1952, **32**, 559.
- [22] KERVAN (P.) et ARÉTAS (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1947, **40**, 270.
- [23] BABLET (J.), JONCHÈRE (H.) et MARTIN (M.). *Presse Méd.*, 1949, **57**, 1237.
- [24] CRUMRINE (R. M.) et KESSEL (J. F.). *Am. J. Trop. Med.*, 1931, **11**, 435.
- [25] MELENEY (H. E.). *Am. J. Trop. Med.*, 1940, **20**, 603.
- [26] MOORE (M.) et JORSTAD (L. H.). *Ann. Otol. Rhin. Laryng.*, 1943, **52**, 779.
- [27] ALMEIDA (F. DE). *Folia Clin. Biol. Sao Paulo*, 1953, **20**, 183.
- [28] BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1918, **166**, 308.
- [29] BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1919, **33**, 184.
- [30] NÈGRE (L.) et BOQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1918, **32**, 215.
- [31] CATANEI (A.). *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1945, **23**, 260.
- [32] DROUHET (E.) et SCHWARZ (J.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, **47**, 128.
- [33] DUBOIS (A.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ant. v. Leeuw.*, 1956, **22**, 103.
- [34] GANZIN (M.), DEPOUX (R.), MERVEILLE (P.) et AUDEBAUD (G.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955, **48**, 303.

- [35] MOORE (M.). *Am. J. Path.*, 1955, **31**, 1049.
- [36] VANBREUSEGHEM (R.). *Mycologia*, 1956, **48**, 264.
- [37] WEED (L. A.). *Am. J. Clin. Path.*, 1954, **23**, 921.
- [38] BINDFORD (C. H.). *Am. J. Clin. Path.*, 1955, **25**, 25.
- [39] SCHWARZ (J.). *Am. J. Clin. Path.*, 1953, **23**, 898.
- [40] TAGER (M.) et LIEBOW (A. A.). *Yale J. Biol. Med.*, 1941-1942, **14**, 469.
- [41] WRIGHT (R. B.) et HACHTEL (F. W.). *Ann. Int. Med.*, 1941, **15**, 309.
- [42] MERVEILLE (P.), AUDEBAUD (G.) et CECCALDI (J.). *Bull. Soc. Path.*, 1954, **47**, 566.
- [43] DROUHET (E.) et SEGRETAIN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 381.
- [44] WALKER (J.). Communication personnelle.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ANTIGÈNE ÉRYTHROCYTAIRE HUMAIN A₁

par J. M. FINE, A. EYQUEM et J. THÉBAULT (*)

(Institut Pasteur.)

Au cours de la détermination des antigènes de groupes sanguins, nous avons été amenés à étudier de plus près le sang d'une jeune fille de 13 ans (M^{lle} G...), qui semblait présenter des anomalies : son sérum contenait une forte agglutinine anti-B, une plus faible agglutinine anti-A ; ses globules inagglutinables en tube à l'aide de sérum anti-A et anti-B l'étaient à l'aide de sérum provenant de donneur du groupe O. Devant ces caractères, on pouvait être en présence d'un antigène A₃ ou A₄.

Indépendamment des antigènes A₁ et A₂ individualisés par von Dungern et Hirsfeld à l'aide de sérums absorbés et étudiés par Landsteiner et Levine, d'autres antigènes appartenant à la même famille ont été isolés ; mais ils peuvent être considérés comme possédant une plus faible quantité d'antigène A. Un antigène A₃ a été décrit indépendamment par Fischer et Hahn (1935) et Friedenreich, caractérisé par sa faible agglutinabilité par des sérums anti-A de titre élevé. Cet antigène a été étudié par Gammelgaard et Marcussen (1940), Moureau, Wiener et Silvermann, Kamman (1942), Dahr (1942). Sa transmission héréditaire a été précisée par Friedenreich (1936), Moullec et Diacono (1950). Cet antigène présente les caractères suivants :

1° Il n'est décelable qu'à l'aide de puissantes agglutinines anti-A (provenant indifféremment de sujets de groupes B ou O) ; l'agglutinabilité des globules porteurs de cet antigène reste faible, elle est moins élevée que celle de globules A₂B ; le pouvoir d'absorption est plus faible que celui des globules A₂B.

2° Le sérum des individus possédant l'antigène A₃ contient parfois des agglutinines de faible titre, actives sur les globules rouges A₁ et A₂ à 4° et sur les globules rouges A₁ à 18°.

D'autres antigènes ont été décrits et désignés par A₄ [Gammelgaard (1940), Friedenreich (1937), Hirsfeld et Amzel (1940), Sachs (1943), Estola et Ello (1952), Dunsford (1952-1953-1954), Spielman

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1956.

(1953), Van Loghem et Van der Hart (1954)]. On peut considérer que cet antigène possède les caractères suivants :

1° Il est assez facilement décelable à l'aide de sérum anti-A de sujets appartenant au groupe O, mais il ne l'est que par des réactions microscopiques d'agglutination à l'aide de sérum de sujets du groupe B, surtout lorsqu'il possède une immunagglutinine anti-A ; il ne l'est pas par les hétéro-immunsérums anti-A de lapin absorbés.

2° Le sérum des individus A₄ contient une agglutinine anti-A active sur les globules A₁ et A₂ à une température optimum de 4°.

3° Leur salive contient la substance O (ou H), mais pas de substance A.

4° Les globules rouges A₄ sont fortement agglutinés par les sérums anti-H.

Une étude plus complète a été entreprise pour préciser les caractères antigéniques du sang de cette jeune fille :

1° Les globules rouges mis en suspension en eau physiologique ne sont pas agglutinables, à l'examen microscopique, par l'agglutinine anti-A contenue dans le sérum de dix sujets du groupe B. Six de ces sérums possèdent des agglutinines naturelles, quatre contiennent des immunagglutinines consécutives à une immunisation par des substances de groupe sanguin (un seul sérum possédant une agglutinine titrant 1/4 000 provoquait une faible agglutination des globules, visible à l'examen microscopique, sous forme de petits amas de trois ou quatre globules rouges).

2° Les globules sont, au contraire, fortement agglutinables par le sérum de 10 sujets, et plus faiblement par le sérum de 2 autres sujets du groupe O.

Cette agglutinabilité n'est plus visible lorsque le sérum est dilué au 1/8, alors que l'agglutinabilité des globules A₂ est encore visible à la dilution du 1/1 000 et celle des globules A₁ à la dilution de 1/2 000.

Le pouvoir d'absorption des globules de M^{lle} G... a été comparé à celui de globules A₂, vis-à-vis de dilutions différentes d'une agglutinine anti-A provenant d'un donneur O, chaque fraction de sérum étant ensuite titrée vis-à-vis de globules A₂.

La comparaison des deux courbes d'absorption montre que les globules de M^{lle} G... possèdent une antigénicité A certaine, mais beaucoup plus faible que celle des globules A₂ (fig. 1).

A partir des globules de M^{lle} G..., mis en contact avec l'agglutinine anti-A de sujets de groupe O, on peut obtenir par élution un éluat contenant une agglutinine anti-A active sur les globules A₁ et A₂ et sur ceux de M^{lle} G...

Ces globules sont agglutinables par un sérum anti-H (*Anguilla anguilla*) ainsi que par une phyto-agglutinine ou lectine de *Ulex europaeus*.

L'agglutinabilité de ces globules n'est pas modifiée après traitement par la papaïne.

Ils ne sont pas agglutinables par le sérum de cynocéphales, débarrassé de l'hétéroagglutinine anti-humaine et contenant une agglutinine anti-A titrant 500, ou par le sérum de certains reptiles (*Vipera aspis*).

Le sérum de M^{lle} G... possédait une agglutinine active au 1/8 ou 1/16 sur les globules A₁ et 1/1 à 1/2 sur les globules rouges A₂

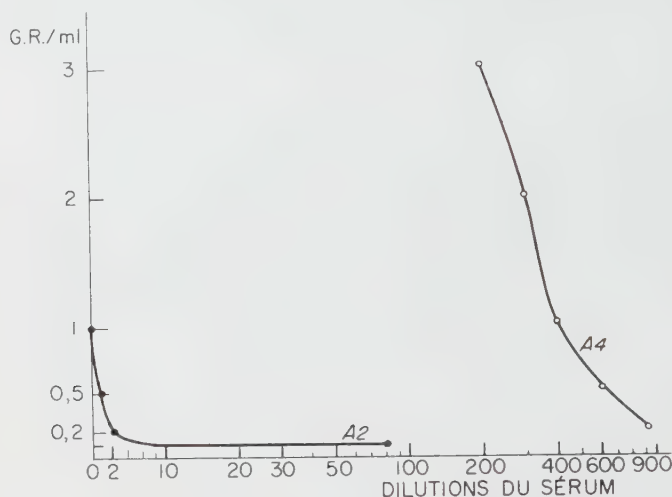


FIG. 1. — Comparaison du pouvoir d'absorption de globules rouges A₂ et A₄ pour l'agglutinine anti-A d'un individu de groupe O.

à la température optimale de 4° C après dix-huit heures. Cette agglutinine qui agit à la température de 22° n'est que très faiblement active à 37° C.

Il n'existe pas d'isoagglutinine irrégulière.

ÉTUDE FAMILIALE

L'examen du sang des parents et collatéraux (deux frères et une sœur) a permis une étude sommaire de la transmission de ce caractère.

Le père appartient au groupe O, génotype OO ;

La mère appartient au groupe A₄, génotype A₄O (probable).

En effet :

Un enfant appartient au groupe O, génotype OO ;

Trois enfants appartiennent au groupe A₄, génotype A₄O.

TABLEAU I.

GRUPE	G. R.	10 α (B)	6 β A'	8 α/β O	2 α/β O	Salive O + B α/β O	Salive + A α/β O	ANTI-H agglutina	ANTI-H Lecture	α SINGE	α REPTILE	Sérum	G. R. A ₁ 4°C	G. R. A ₁ 4°C	G. R. B 27°C	G. R. O 22°C
O	Père G. M	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	G. M	128	32	#	-
A ₄	Mère G. G	-	-	#	±	#	-	#	#	-	-	G. G	8	1	#	-
A ₄	Enf. G. F ♀	-	-	#	±	#	-	#	#	-	-	G. F.	#	+	#	-
O	Enf. u. A ♂	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-	G. A	32	16	#	-
A ₄	Enf. G. G ♀	-	-	#	±	#	-	#	#	-	-	G. G	16	2	#	-
A ₄	Enf. G. C ♀	-	-	#	±	#	-	#	#	-	-	G. C.	16	1	#	-

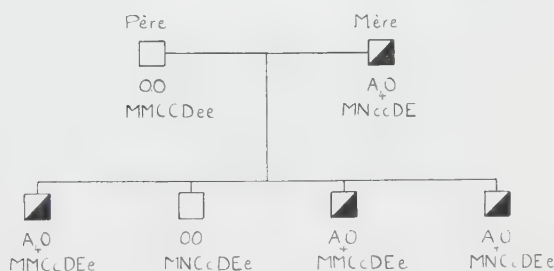


FIG. 2.

L'étude de l'antigène possédé par ces quatre sujets a permis de retrouver tous les caractères observés pour M^{lle} G... (tableau I). La transmission héréditaire de cet antigène se fait donc, dans le cas présent, suivant le mode mendélien habituel (fig. 2), alors que dans les cas étudiés par Van Loghem et coll., les parents appartenaient tous deux au groupe O, dans une famille, 3 enfants sur 4 et, dans l'autre, 2 sur 3 possédaient l'antigène A₄.

L'antigène A₄ ainsi individualisé pose différents problèmes ; si on ne connaît pas ses relations avec celui désigné par A₆ (Jons-son), il semble différent de l'antigène A₀ décrit par Grove-Rasmussen et Levine (Dunsford : communication personnelle), car le sérum de sujets possédant l'antigène A₀ n'agglutine pas les globules A₁ même à 4° C.

Il est assez difficile d'expliquer l'activité des sérums anti-A,

anti-B que Wiener et Unger attribuent à l'existence d'un antigène C commun aux caractères A et B. Le même résultat pourrait être obtenu dans le cas de molécules possédant une double spécificité anti-A et anti-B. Néanmoins, nous avons constaté que dix sérums anti-A, anti-B de sujets O, neutralisés par de la salive d'individus sécréteurs de groupe B, ou par de la substance B purifiée, conservent leur pouvoir agglutinant sur les globules rouges A_4 , alors que la neutralisation par de la salive d'individu sécréteur A ou de la substance A purifiée d'origine porcine ou équine, fait disparaître tout pouvoir agglutinant sur les globules rouges A_4 tout en respectant l'agglutinine active sur les globules B.

Une étude plus approfondie permettra d'apporter des arguments en faveur de l'une ou l'autre théorie. Du point de vue pratique, cette observation permet de souligner l'intérêt de l'utilisation de sérum anti-A, anti-B au cours de la détermination des groupes sanguins.

Dans le cas de transfusion de sang A_4 à un receveur O, on peut estimer que si ce dernier ne présente pas de choc transfusionnel, il ne retirera guère de bénéfice de la transfusion, les hématies-transfusées étant plus rapidement éliminées que normalement. Cet accident peut être considéré comme d'une éventualité exceptionnelle, car la fréquence de l'antigène A_4 est faible, puisqu'il ne se retrouve que chez un individu, sur 8 à 40 000.

Nous remercions MM. I. Dunsford, Chef du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Sheffield (G.-B.) et J. J. Van Loghem Jr., Directeur du Laboratoire Central de la Croix-Rouge Néerlandaise, de l'intérêt qu'ils ont témoigné pour cette observation.

RÉSUMÉ

L'antigène A_4 a été étudié chez quatre individus appartenant à une même famille française. Cet antigène, d'une fréquence de 0,0001 en Grande-Bretagne et au Danemark, n'avait pas encore été signalé en France.

SUMMARY.

Antigen A_4 has been studied in four humans, belonging to the same French family.

In Great Britain and Denmark this antigen has a frequency of 0,0001, but it had not yet been found in France.

BIBLIOGRAPHIE

- DUNSFORD (I.). *Nature*, 1953, **172**, 1059.
- DUNSFORD (I.). *Vox sanguinis*, 1952, **2**, 209.
- DUNSFORD (I.) et HUTCHISON (A. M.). *Vox sanguinis*, 1953, **3**, 6.
- DUNSFORD (I.). *Vox sanguinis*, 1955, **5**, 104.
- DUNSFORD (I.). V^e Cong. Intern. Transf. Sang., Paris, sept. 1954.
- ESTOLA (E.) et ELLO (J.). *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 1952, **30**, 79.
- FISCHER (W.) et HAHN (F.). *Z. Immunitätsf.*, 1935, **84**, 177.
- FRIEDENREICH (V.). *Z. Immunitätsf.*, 1936, **89**, 409.
- GAMMELGAARD (A.) et MARCUSSEN (P. V.). *Z. Immunitätsf.*, 1940, **98**, 411.
- GROVE-RASMUSSEN (M.), SOUTTER (L.) et LÉVINE (P.). *Amer. J. clin. Path.*, 1952, **22**, 12.
- HIRSZFELD (L.) et AMZEL (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **65**, 386.
- MOULLEC (J.) et DIACONO (G.). *Rev. Hématol.*, 1950, **5**, 318.
- MOUREAU (P.). *Acta Biol. Belg.*, 1943, **3**, 22.
- SPIELMAN (W.). *Klin. Wschr.*, 1953, **31**, 337.
- VAN LOGHEM (J. J. Jr.) et VAN DER HART (M.). *Vox sanguinis*, 1954, **4**, 69.
- JONSSON (B.) et FAST (K.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1948, **25**, 649.

ÉTUDE SUR LA RÉPARTITION DES GROUPES SANGUINS EN IRAN. II.

par ANDRÉ BOUÉ et JOELLE BOUÉ *.

(Institut Pasteur de l'Iran.
Service de Transfusion Sanguine de la Société
Lion et Soleil Rouges)

I. — POPULATION MUSULMANE DE TÉHÉRAN.

Téhéran est la capitale de l'Iran depuis 160 ans seulement. Sa population est composée principalement de Persans, issus du plateau iranien, qui parlent la langue persane, et de Turcs, venus surtout du nord-ouest du pays, de la province de l'Azerbaïdjan et qui parlent un dialecte turc, le turc azéri. Ces deux éléments se sont rapidement mélangés, étant de même religion musulmane chiite. Nous avons étudié les groupes sanguins de cette population, sans distinction des deux collectivités, sous la dénomination de « population musulmane de Téhéran » (1) [tableau I].

SYSTÈME RH. — Nous avons testé un premier groupe de 203 sujets avec les sérums-tests anti-C, anti-D, anti-E et anti-c, et un deuxième groupe de 500 sujets avec le seul sérum-test anti-D.

Les fréquences des gènes ont été calculées selon les formules de Mourant [4] (tableau II).

SYSTÈME DUFFY. — Nous avons testé 135 sujets :

Fy (a+)	111	82,22 %	Fy ^a 0,5784
Fy (a-)	24	17,78 %	Fy ^b 0,4216

Il nous a semblé intéressant d'établir une comparaison entre ces chiffres et ceux des études que nous avons faites dans différentes provinces iraniennes. La population de Téhéran, dont l'extension remonte surtout aux vingt-cinq dernières années, ne peut être

(*) Manuscrit reçu le 10 juin 1956.

(1) A côté de cette population musulmane, se sont installées, certaines depuis fort longtemps, des minorités ethniques, qui sont toujours restées très isolées, principalement à cause de leur religion. Nous avons testé des éléments des collectivités russes et arméniennes (à paraître).

TABLEAU I.

SYSTÈME ABO

	TOTAL	O	A	B	AB	p	q	r
Nb	3049	1063	1036	721	229	0,2356	0,1706	0,5937
%		34,86	33,98	23,65	7,51			

Les fréquences des gènes ont été calculées par les formules ajustées de Bernstein

SOUS-GROUPES DE A ET AB

	TOTAL	O	A ₁	A ₂	B	A ₁ B	A ₂ B	p ₁	p ₂	q	r	INDICE A ₂ /A ₁
Nb	1239	427	351	61	301	83	16	0,1951	0,0404	0,1792	0,5853	0,173
%		34,46	28,33	4,92	24,29	6,70	1,30					

SYSTÈME MN

	TOTAL	M	MN	N	m	n
Nb	256	104	117	35		
%		40,63	45,70	13,67	0,635	0,365

TABLEAU II.

				PREMIER GROUPE		DEUXIÈME GROUPE		
C	D	E	c		Nb.	%	Nb.	%
—	—	—	+	rh rh	17	8,37	43	8,6
+	—	—	+	rh' rh	2	0,99		
—	+	—	+	Rh ₀ rh	4	1,97		
—	+	+	+	Rh ₂ rh	18	8,87		
+	+	—	+	Rh ₁ rh	82	40,39		
+	+	+	+	Rh ₁ Rh ₂	42	20,69		
+	+	—	—	Rh ₂ Rh ₁	38	18,72	457	91,4
c d e			r		0,3074			
C d e			r'		0,0196			
c D e			R ₀		0,0342			
C D e			R ₁		0,4778			
c D E			R ₂		0,1608			
						0,2932		

tenue pour homogène : on peut la considérer comme un mélange des populations du Centre, du Nord et de l'Ouest de l'Iran, qui ont fourni le plus gros apport à la ville.

SYSTÈME ABO. — Nous avons réuni ces diverses études par groupes linguistiques dans le tableau III.

Nous avons calculé les tests d'homogénéité entre les résultats obtenus dans ces collectivités et les résultats de Téhéran :

Entre Gorgan et Téhéran $\chi^2 = 2,02$ soit une probabilité supérieure à 0,50.

Entre Khan Beben et Téhéran $\chi^2 = 2,14$ soit une probabilité supérieure à 0,50.

Entre les tribus kurdes et Téhéran $\chi^2 = 4,27$ soit une probabilité supérieure à 0,20.

Entre Akinlou et Téhéran $\chi^2 = 1,33$ soit une probabilité supérieure à 0,70.

Entre la tribu des Shabsavans et Téhéran $\chi^2 = 7,74$ soit une probabilité supérieure à 0,05.

Entre le Guilan et Téhéran $\chi^2 = 3,44$ soit une probabilité supérieure à 0,30.

Les tests d'homogénéité sont satisfaisants pour tous les groupes étudiés, sauf pour la tribu des Shahsavans, la différence la plus frappante étant une fréquence élevée du gène A et en opposition une fréquence faible du gène O. La situation géographique de ces habitants, dans le delta de l'Araxe, juste au Sud du Caucase oriental, peut expliquer ces fréquences : en effet, ces régions sont caractérisées par une fréquence particulièrement élevée du gène A.

TABLEAU III.

		Nb.	O	A	B	AB	p	q	r
COLLECTIVITES DE LANGUE PERSANE	VILLE DE GORGAN (a)	537	37,2	31,4	22,5	8,9	0,21922	0,16348	0,61717
	KHAN BEBEN PROVINCE DE GORGAN (b)	134	33,7	34,3	21,6	10,4	0,23624	0,14831	0,61524
COLLECTIVITES PARLANT UN DIALECTE TURC	AZERBAIDJAN TRIBU DES SHAHSAVANS (c)	247	27,53	36,03	25,10	11,33	0,27282	0,20097	0,52621
	PROVINCE DU GUILAN (d)	225	31,11	34,22	24,00	10,67	0,25277	0,18606	0,56155
	AKINLOU PROVINCE D'HAMADAN (e)	115	29,57	33,04	26,96	10,43	0,24768	0,20725	0,54506
COLLECTIVITES DE LANGUE KURDE	(2)	375	39,73	33,87	20,27	6,13	0,22570	0,14230	0,63199

a) La ville de Gorgan est située au bord de la Mer Caspienne. Cette étude comporte uniquement des sujets de langue persane.

b) Le village de Khan Beben bien que situé en bordure du Turkménistan a une population exclusivement persane implantée au ^{xvii}^e siècle pour endiguer la poussée mongole.

c) La tribu des Shahsavans habite le Dacht-é-Moghan (Steppe de Moghan). Cette région fait partie au point de vue administratif de l'Azerbaïdjan, mais elle appartient au système géographique du Delta de l'Araxe et de la côte caspienne. C'est une tribu turque, formée au ^{xvii}^e siècle par Chah Abbas, en fractionnant d'autres tribus turques pour en briser le pouvoir. Il s'agit donc d'une population turque azérie. La garde impériale est recrutée traditionnellement parmi les membres de cette tribu.

d) La province du Guilan borde la côte sud-ouest de la Mer Caspienne, sa population n'est pas uniforme, comprenant selon les régions des habitants parlant le persan ou des dialectes turcs.

e) Le village de Akinlou est situé aux confins des régions de langue turque et de langue kurde, les habitants parlent un dialecte turc.

De l'ensemble de ces résultats il ressort que la fréquence du gène A (p) reste assez constante dans ces différents groupes et qu'elle oscille autour de 0,23. Par contre la fréquence du gène B (q) augmente régulièrement lorsqu'on passe des populations kurdes (0,14) aux populations persanes (0,15-0,16) puis aux

populations turques azéries (0,20). Cette progression est en accord avec la progression Ouest-Est de la fréquence du gène B. Les Turcs azéris, bien que maintenant fixés dans le Nord-Ouest de l'Iran sont d'origine turco-mongole et sont à rattacher aux populations d'Asie centrale. La fréquence du gène O suit un mouvement inverse. Les résultats de Téhéran semblent explicables par le fait que cette ville située dans une région de langue persane reçoit encore régulièrement un apport important de population de langue turque azérie (population qui constitue la masse ouvrière de la ville).

SYSTÈME RH. — Nous donnons dans le tableau IV les résultats concernant cinq collectivités. Il semble possible de les diviser en deux groupes : l'un constitué par des populations habitant le Centre et l'Ouest de l'Iran et où la fréquence du gène r oscille autour de 0,30 ; le deuxième groupe par des populations habitant en bordure de la Mer Caspienne et où la fréquence du gène r est plus basse : 0,24-0,25.

TABLEAU IV.

				KHAN BEBEN		GUILAN		KURDES		SHAHSAVANS		AKINLOU		
C	D	E	c		Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%
—	—	—	+	rh rh	8	6,02	13	6,57	25	9,84				
+	—	—	+	rh' rh	1	0,75	1	0,50	4	1,57	9	6,57	12	10,2
+	—	—	—	rh' rh'			1	0,50	1	0,39				
—	+	+	+	Rh ₂ rh	7	5,26	27	13,64	15	5,91				
+	+	—	+	Rh ₁ rh	45	33,83	56	28,28	84	33,07				
+	+	+	+	Rh ₁ Rh ₂	19	14,29	43	21,72	44	17,32				
+	+	—	—	Rh ₁ Rh ₁	46	34,58	49	24,75	55	21,65	128	93,43	103	89,8
+	+	+	—	Rh ₁ Rh ₂			4	2,02	6	2,36				
—	+	—	+	Rh ₀ rh	7	5,26	4	2,02	20	7,87				
					133		198		254		137		115	
cde				r	0,23455		0,24914		0,28576		0,2563		0,3193	
Cde				r'	0,01532		0,00989		0,02542					
cDe				R ₀	0,07195		0,03573		0,09761					
CDe				R ₁	0,57464		0,49515		0,45363					
cDE				R ₂	0,10312		0,18975		0,11275					
CDE				R ₂			0,02019		0,02476					

Nous n'avons pas encore pu faire de détermination concernant les systèmes MN et Duffy dans ces régions de l'Iran.

Les résultats de Téhéran étant représentatifs des régions Centre et Ouest de l'Iran, il est intéressant de les comparer avec les autres pays du Moyen-Orient. A l'exception des travaux de Kayssi [3] à Baghdad, toutes les études sont assez anciennes [4] et ne concernent que le système ABO. D'autre part, la complexité des questions religieuses dans ces régions doit faire éliminer d'emblée toutes les études concernant des populations non musulmanes. Nous verrons qu'à Téhéran également les minorités religieuses chrétiennes diffèrent complètement de l'ensemble de la popu-

lation. En outre nous devons écarter les déterminations faites chez les Bédouins, qui représentent des isolats trop restreints.

Les chiffres de Téhéran sont comparables aux résultats concernant les musulmans de Beyrouth [5] et les Arabes d'Alep [6] :

$$p = 0,25 \quad q = 0,15 \quad r = 0,59$$

Et les résultats concernant les Arabes d'Irak [7, 8] :

$$p = 0,21 \quad q = 0,20 \quad r = 0,59$$

Nous n'avons trouvé aucune étude concernant l'Est de la Turquie.

Les seules études relatives au système MN ont été faites par Boyd et Boyd [8] ; soit en Irak, soit dans le Caucase la fréquence du gène M dépasse 0,60.

Nous donnons dans le tableau V la comparaison entre la fréquence des gènes Rh à Baghdad [3] et à Téhéran. Il existe une grande similitude dans ces résultats (tableau V).

TABLEAU V.

	BAGHDAD (KAYSSI)	TÉHÉRAN	
		PREMIER GROUPE	DEUXIÈME GROUPE
r	2840	3074	2932
r'	0176	0196	
r''	0115		
R ₀	0977	0342	
R ₁	4374	4778	
R ₂	1518	1608	

II. RÉPARTITION DES GROUPE SANGUINS CHEZ LES TURKMÈNES YOMUT (avec la collaboration de A. Agir).

Le Turkménistan persan s'étend à l'Est de la Mer Caspienne, au Sud de la frontière soviétique ; c'est la prolongation naturelle du Turkménistan russe, limité au Sud par la chaîne de l'Elbourz. Deux tribus habitent cette région : les Göklen et les Yomut. Les Yomut habitent la grande plaine du Turkménistan. Par leur facies mongol, les Turkmènes se distinguent aisément des autres populations persanes ; ils sont restés très séparés des autres collectivités iraniennes, isolés par leur nomadisme, par des différences linguistiques (ils parlent un dialecte turc et ne comprennent pas le persan) et par des différences religieuses (ils sont musulmans sunnites, les Persans sont musulmans chiites).

Nous sommes allés au printemps 1954 dans le Turkménistan persan. La récolte des échantillons de sang a été faite dans le village de Gum-i-Shan, petit port de la Mer Caspienne à 20 km de la frontière soviétique, dans six villages autour de Kumbad-i-Kawus, centre du Turkménistan à 120 km à l'Est et dans le village de Gaïounlou situé à l'Est de Kumbad-i-Kawus (tableau VI).

Boyd [4] cite deux études antérieures à 1939, relatives aux « Turcomans », l'une faite en Irak par Kennedy et Mac Farlane [7] sur 128 sujets : O : 36,6 p. 100 ; A : 38,3 p. 100 ; B : 17,2 p. 100 ; AB : 7,8 p. 100 ; les fréquences des gènes étant : p 0,260 ; q 0,128 ; r 0,606 ; l'autre étude faite en URSS par Minkievitch [4] sur 1 159 sujets : O : 29,4 p. 100 ; A : 33,9 p. 100 ; B : 27,0 p. 100 ; AB : 10,6 p. 100 ; les fréquences des gènes étant : p 0,253 ; q 0,208 ; r 0,543.

TABLEAU VI.

SYSTÈME ABO

	TOTAL	O	A	B	AB	p	q	r
Nb.	375	95	101	134	44	0,21782	0,27645	0,50572
%		25,40	27,01	35,83	11,83			

SYSTÈME Rh

C	D	E	c		Nb.	%
—	—	—	+	rh rh	13	4,45
—	+	—	+	Rh ₀ rh	9	3,08
—	+	+	+	Rh ₂ rh	44	15,07
+	—	—	+	rh' rh	3	1,03
+	+	—	+	Rh ₁ rh	82	28,08
+	+	+	+	Rh ₁ Rh ₂	34	11,64
+	+	—	—	Rh ₁ Rh ₁	104	35,62
+	+	+	—	Rh ₁ Rh ₂	3	1,03
					292	
	c	d	e	r		0,2320
	C	d	e	r'		0,0229
	c	D	e	R ₀		0,0703
	C	D	e	R ₁		0,5391
	c	D	E	R ₂		0,1358
	C	D	E	R ₂		0,0081

Il serait hasardeux de tenter une comparaison entre ces deux séries turcomanes iraquienne et soviétique et les nôtres. En effet, il est regrettable pour cette étude comparative que toutes les populations d'origine turco-mongole soient réunies sous la dénomination de Turcomans. Curzon [9] cité par Field [10] écrit en 1892 : « Tatars, Turcomans et Turcs sont trois noms interchangeables pour les différentes branches de la même famille ». Or, certains éléments, comme les Turcs, se sont répandus depuis fort longtemps vers l'Ouest où ils se sont mélangés avec les populations locales, tandis que les Turkmènes restés sur leur territoire d'origine, sont demeurés plus isolés. Les Turkmènes sont rangés par les linguistes dans un groupe turc particulier qui comprend également les Kirghizes [11]. Nous avons donc cherché à comparer nos résultats avec ceux concernant des déterminations faites chez d'autres populations turco-mongoles de l'Asie centrale.

Boyd [4] cite un important travail de Libman (antérieur à 1939) portant sur neuf séries de Kirghizes en URSS et totalisant 1 481

sujets. Libman obtient pour les gènes des fréquences se situant autour de 0,18 pour le gène p, 0,27 pour le gène q, 0,55 pour le gène r. La comparaison avec d'autres collectivités turco-mongoles : Tounghouzes (Kunifusa et Makino [12]), Tadjiks [12] et Uzbeks [12] montre qu'il faut rattacher les Turkmènes d'Iran aux populations turco-mongoles établies dans cette région de l'Asie centrale qui s'étend des Monts Altaï à la Mer Caspienne.

Nous avons étudié un petit groupe d'Afghans des régions de Farah et Ghiriskh qu'il est intéressant de comparer à la série très importante de Tadjiks étudiée en Afghanistan par G. Maranjian [16]. Les Tadjiks d'Afghanistan sont considérés comme originaires de l'Iran (tableau VII).

TABLEAU VII.

	AFGHANS		TADJIKS	
	Nb.	%	Nb.	%
	110		1319	
O		29,09		29,7
A		25,45		29,3
B		32,73		31,5
AB		12,73		9,6
p	0,20061		0,223	
q	0,24870		0,237	
r	0,55064		0,545	
D+	92	93,88		
D-	6	6,12		

Les différences entre les Turkmènes et les Persans leurs voisins sont, par contre, très profondes. Dans le chapitre précédent nous avons donné les résultats concernant les populations iraniennes du Centre et de l'Ouest de l'Iran. L'étude du système ABO faite à Gorgan, capitale administrative de la province du Gorgan dans laquelle est compris le Turkménistan, et faite dans le village de Khan Beben à mi-chemin entre Gorgan et Kumbad-i-Kawus et qui est un des derniers villages persans en bordure de la steppe turkmène, montre le passage brutal de la fréquence du gène B de 0,276 chez les Turkmènes (et dans l'ensemble des collectivités turco-mongoles) à des chiffres variant de 0,15 à 0,17, chiffres que l'on retrouve constants chez les autres populations persanes de l'Ouest et du Centre.

Cette scissure profonde entre les deux collectivités turkmène et persane, dont on pourrait presque dresser la carte, s'explique par le fait qu'aux siècles précédents, la politique persane a consisté à implanter en bordure de la steppe turkmène des populations persanes ou kurdes, destinées à arrêter la progression des populations turco-mongoles.

III. — ETUDE DES GROUPES SANGUINS DANS LA RÉGION DE YEZD.

La lecture du récent travail de Moten et Stewart [13] sur les Musulmans et les Parsis de Karachi nous a décidés à publier cette étude des groupes sanguins dans la région de Yezd, pour répondre à la question posée par les auteurs : « Pourquoi les Parsis de Karachi, alors qu'ils sont originaires de l'Iran, n'ont-ils pas une répartition des groupes sanguins semblable à celle des Persans ? »

Nous avons jusqu'à maintenant retardé la publication de cette note car nous trouvions nos résultats trop différents de ceux concernant les autres régions de l'Iran sans qu'il y ait des raisons géographiques ou humaines suffisantes pour expliquer cette anomalie, et nous espérons pouvoir faire de nouvelles prospections plus à l'Est encore pour contrôler ces résultats obtenus en mars 1955.

*
* *

Yezd est situé sur le versant Nord du prolongement oriental du Zagros, au Sud et en bordure du désert salé qui occupe le Centre du plateau iranien, à mi-chemin entre Téhéran et la frontière pakistanaise. Grâce à son altitude, élevée (1 250 m) et à la proximité de hautes montagnes (4 000 m) la région de Yezd est assez fertile.

La raison de notre choix était l'existence dans Yezd et les villages voisins d'importantes communautés zoroastriennes. Les Guèbres sont les derniers disciples de Zoroastre (Zarathoustra) en Iran. La majorité de la population est maintenant musulmane chiite, mais il existe encore plusieurs dizaines de milliers de Zoroastriens. Ils sont groupés dans des quartiers séparés et vivent actuellement en bonne intelligence avec les musulmans. Ils ont leur clergé et pratiquent librement leur culte.

Etant donné que la conversion de l'Iran à l'Islam remonte aux premières années de l'Hégire (622 après J.-C.) les Zoroastriens ont dû, depuis 1 380 ans rester isolés pour pouvoir continuer la pratique de leur religion (2).

Nous avons appris en outre sur place que les mariages entre les deux communautés guèbre et musulmane étaient inconnus.

Nous avons effectué nous-mêmes tous les prélèvements selon la technique indiquée dans notre précédent travail [2], soit à Yezd même (dispensaire de l'hôpital), soit dans les villages voisins :

(2) D'après certains historiens, la conversion à l'Islam de cette région de l'Iran aurait été beaucoup plus tardive et aurait duré jusqu'aux ^{xii}^e et ^{xiii}^e siècles après J.-C. Quoi qu'il en soit, leur isolement religieux remonte sûrement à plus de six cents ans.

au total six villages ont été prospectés parmi ceux comportant le pourcentage le plus élevé de Zoroastriens. La distinction est très facile grâce aux prénoms : les Musulmans empruntent leur prénom à leur religion, les Guèbres, par contre, adoptent les vieux prénoms persans d'avant la conquête arabe ou les noms des personnages de leur mythologie. En outre, chaque collectivité s'est rassemblée dans des quartiers différents nettement délimités.

SYSTÈME ABO. — Nous avons testé 258 sujets de religion musulmane chiite et 233 sujets de religion zoroastrienne, soit deux groupes sensiblement égaux.

SYSTÈME RH. — Nous avons testé 145 Musulmans avec le seul sérum-test anti-D et 182 Zoroastriens avec les sérums anti-C, anti-D et anti-E (tableau VIII).

TABLEAU VIII.

MUSULMANS			ZOROASTRIENS	
	Nb.	%	Nb.	%
O	82	31,78	69	29,61
A ₁	45	17,45	35	15,02
A ₂	12	4,65	9	3,86
B	90	34,88	91	39,06
A ₁ B	19	7,36	17	7,30
A ₂ B	10	3,88	12	5,15
p ₁	0,13133	0,17143	0,11893	0,15364
p ₂	0,04010		0,03471	
q	0,25439		0,28724	
r	0,57412		0,55901	
INDICE A ₂ /A ₁	0,2666		0,257	
C D E	10	6,89	9	4,94
- - -			2	1,10
+ - -			2	1,10
- + +			16	8,79
+ + -	135	93,11	105	60,99
+ + +			42	23,08
r	0,2625		0,2037	
r'			0,0255	
R ₀			0,0203	
R ₁			0,5786	
R ₂			0,1714	

DISCUSSION.

1° La séparation religieuse bien qu'elle ait complètement isolé les deux groupes et qu'elle ait persisté pendant plus d'un millénaire, n'a amené aucune différence entre les deux collectivités. *Il s'agit bien de la même population* : les tests d'homogénéité donnent un χ^2 de 1,13, soit une probabilité supérieure à 0,70.

2° Par contre, il existe une dissemblance considérable entre les collectivités de Téhéran et de l'Ouest de l'Iran et les groupes Yezdis. Par exemple, la fréquence du gène B (q), qui est de 0,170 à Téhéran, passe à 0,254 et même 0,287 à Yezd.

3° A l'opposé de cette énorme différence avec les populations de la moitié Ouest de l'Iran, on est étonné de la similitude qui existe entre nos résultats et ceux concernant les populations musulmanes et parsies de Karachi testées récemment par Moten et Stewart, conforme également aux résultats trouvés par Boyd [44] au Punjab, et Chaudhri et ses collaborateurs [45] chez des sujets originaires du Nord-Ouest du Pakistan (tableau IX).

TABLEAU IX.

	KARACHI		YEZD		PUNJAB	N-O PAKISTAN
	MUSULMANS	PARSI	MUSULMANS	GUEBRES		
O	25 %	31 %	31,78 %	29,61 %	33,33 %	27,72 %
A ₁	20	21	17,45	15,02	20,58	23,76
A ₂	6	4	4,65	3,86		
B	39	33	34,88	39,06	32,83	39,60
A ₁ B	8	8	7,36	7,30	13,23	8,91
A ₂ B	2	3	3,88	5,15		

C'est à Yezd même que nous avons été amenés à trouver la réponse à la question de Moten et Stewart. En effet, les auteurs ont dû, pour comparer leurs chiffres sur les Parsis et les Musulmans de Karachi, se référer aux seuls résultats parus alors, ceux de Agir ou Motamed, relatifs à des études faites chez les sujets de Téhéran. Nous avons vu que la répartition des groupes sanguins de la population de Téhéran pouvait être prise pour type de la répartition dans l'Ouest de l'Iran, or les Parsis de Karachi (comme ceux de Bombay) ne viennent pas de l'Ouest de l'Iran, mais traditionnellement de la région de Yezd même et, sur place, nous avons pu confirmer ce fait. Lors des prélèvements effectués dans les quartiers zoroastriens, nous avons été frappés de voir surtout des femmes; celles-ci nous ont dit que les hommes étaient en Inde d'où ils reviennent quelques mois chaque année. Notre enquête nous a appris également que les Musulmans ne participaient que rarement à ces échanges avec l'Inde.

Il existe donc, malgré les immenses étendues désertiques et la distance les séparant (Yezd-Karachi, 1 500 km à vol d'oiseau), des relations étroites entre les villes occidentales de la péninsule indienne et la région de Yezd; en fait les échanges se font principalement par voie maritime à partir du port de Bender-Abbas dans le Golfe Persique, ce qui explique que les Parsis se trouvent essentiellement dans les ports: Bombay, Karachi.

IV. — CONCLUSION.

L'Iran politique actuel est basé sur un ensemble géographique homogène : le haut plateau iranien et les deux versants de sa ceinture montagneuse. Au centre de cet ensemble, le désert salé forme une dépression triangulaire à sommets Ouest, Nord-Est et Sud-Est. Ce désert, encore infranchissable de nos jours (les cartes de l'armée américaine portent la mention « Great Salt Desert, impassable for all arms »), nous semble responsable des séparations qui existent entre les populations des trois parties de l'Iran ainsi délimitées.

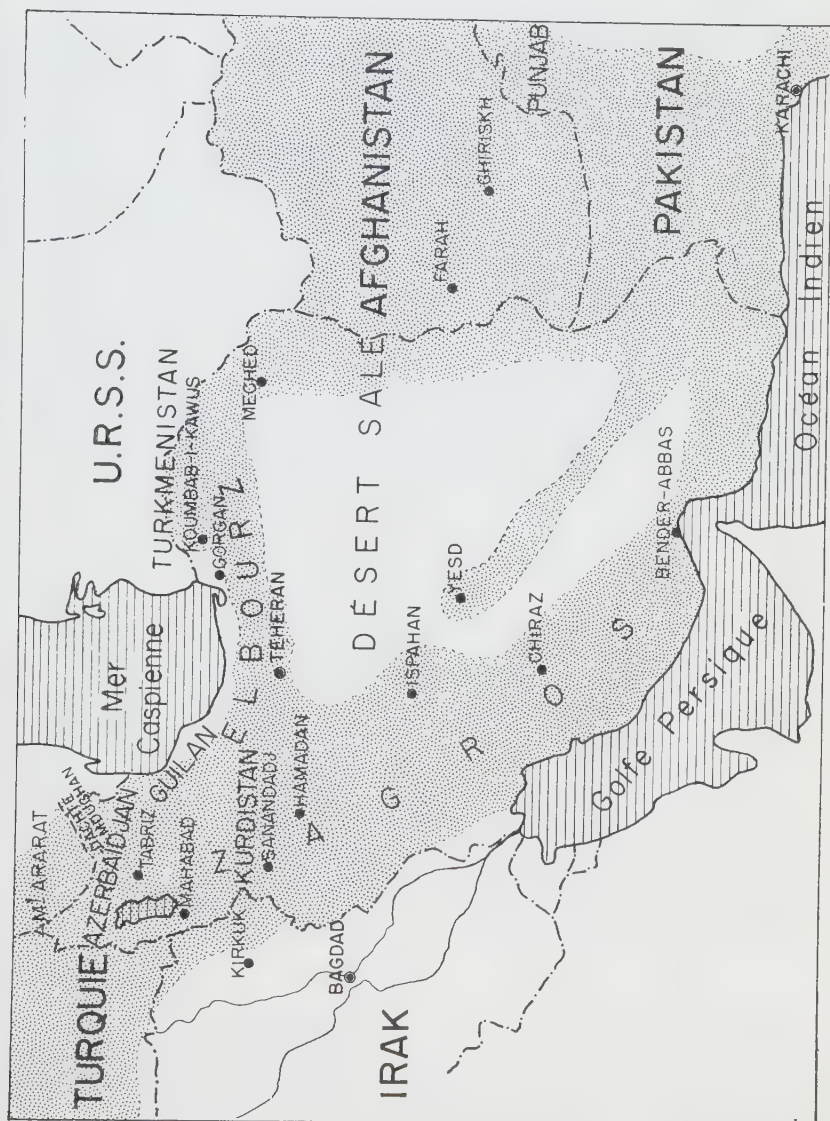
L'Ouest de l'Iran. — C'est le noyau de la Perse historique. Cette région est formée essentiellement par l'immense système montagneux des Monts Zagros et par la partie occidentale de l'Elbourz. Le Zagros enserre entre ses innombrables plissements de fertiles vallées ; son versant Ouest forme la frontière occidentale de l'Iran, largement ouverte sur le bassin du Tigre et de l'Euphrate. Ses fraîches vallées accueillent pendant l'été les transhumants de la Mésopotamie. C'est une vaste zone d'échange et d'influence tournée vers le Proche-Orient, la Méditerranée et l'Occident. Au Nord la chaîne de l'Elbourz borde la riche côte de la Mer Caspienne.

Depuis toujours la vie de l'Iran s'est concentrée dans cette partie du pays, les 4/5 de la population de l'Iran habitent ce territoire. On y trouve les grandes villes : Tabriz, Chiraz ; les anciennes capitales : Ekbatane (Hamadan), Ispahan ; enfin Téhéran.

Nous avons noté l'unité de la répartition des groupes sanguins dans cette région de l'Iran et nous proposons de prendre pour type de cette répartition les résultats de Téhéran, creuset moderne de toute cette partie du pays, avec les fréquences géniques suivantes : gène A (p) 0,235 ; gène B (q) 0,170 ; gène O (r) 0,593. La fréquence du gène r (rhrh) est située autour de 0,300. Nous avons vu, en outre, que ces résultats étaient comparables à ceux obtenus dans les pays voisins de l'Ouest.

Le Nord-Est. — Cette région comprend le prolongement oriental de l'Elbourz. La chaîne orientée Ouest-Est s'élève entre le désert salé au Sud et, au Nord, l'immense steppe qui s'étend de la Mer Caspienne aux Monts Altaï. La steppe a été la voie des invasions turco-mongoles. Les invasions furent arrêtées non pas par la montagne, mais par le désert salé, et des populations mongoles se sont installées dans les hautes vallées. Nous avons vu que les Turkmènes de l'Iran se rattachaient au point de vue ethnique aux populations turco-mongoles de l'Asie centrale et l'étude des groupes sanguins tend à confirmer ce rapprochement.

Les caractéristiques géniques de cette partie du pays sont les



suivantes : gène A (p) 0,217 ; gène B (q) 0,276 ; gène O (r) 0,505. Le pourcentage de Rh négatif est moins élevé que dans la partie occidentale de l'Iran, le gène r (rhrh) a une fréquence de 0,254.

Le Sud-Est. — Ce territoire est constitué par les chaînes montagneuses qui joignent le Zagros au Beloutchistan, cette région est semi-désertique et très peu peuplée.

Nous venons de voir la similitude des groupes sanguins entre les populations de Yezd et celles de la péninsule indienne qui laisse à penser qu'il s'agit de la même population testée dans les deux pays et dont les caractéristiques géniques sont : gène A (p) 0,160, gène B (q) 0,270 ; gène O (r) 0,566. La fréquence du gène r (rhrh) est aussi très basse puisqu'elle se situe autour de 0,245.

SUMMARY.

Study of the blood group distribution in different provinces of Persia. The results obtained suggest that Iran can be divided into three main parts, each of them being separated from the others either by deserts (Great Salt Desert) or by mountains with only a few passes.

1° The West part, corresponding to historical Persia and where 4/5 of the population live. The results obtained in the town of Teheran can be considered as the distribution pattern in this region, with the following gene frequencies : A gene (p), 0,235 ; B gene (q), 0,170 ; O gene (r), 0,593 ; r gene (rhrh), 0,300.

2° The North-East region, the turkmene steppe, comprised between the Caspian Sea and the North of Afghanistan, is inhabited by turco-mongol tribes, whose gene frequencies are : A gene (p), 0,217 ; B gene (q), 0,276 ; O gene (r), 0,505 ; r gene (rhrh), 0,254.

3° In the South-East region it seems possible to assimilate the scattered populations which inhabit this territory with the inhabitants of Pakistan, with the following gene frequencies : A gene (p), 0,160 ; B gene (q), 0,270 ; O gene (r), 0,566 ; r gene (rhrh), 0,245.

★★

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidés dans ce travail : ceux qui nous ont accompagnés dans nos expéditions (D^r Pournaki, D^r Machoun), ceux qui ont bien voulu nous prélever des échantillons de sang au cours de leurs propres recherches (D^r Carleton D. Gajdusek, D^r Bahmanyar). Nous adressons également nos remerciements à M. A. Eyquem et à M. J. Moulloc, qui nous ont approvisionnés sans compter en sérums-tests, à M. R. Khérumian qui nous prodigua ses conseils.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MOURANT (A. E.). *Distribution of the human blood groups*, Blackwell, édit., Londres, 1954.
- [2] BOUÉ (A.) et BOUÉ (J.). *Le Sang*, 1955, **26**, 705.
- [3] KAYSSI (A. I.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1949, **7**, 549.
- [4] BOYD (W. C.). *Blood groups. Tabulae Biologicae*. 1939, **17**, 113.
- [5] PARR (L. W.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1931, **16**, 15.
- [6] ALTOURNYAN (E. H. R.). *Brit. med. J.*, 1928, **1**, 546.
- [7] KENNEDY (W. P.) et MAC FARLANE (J.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1936, **21**, 87.
- [8] BOYD (W. C.) et BOYD (L. G.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1937, **23**, 49.
- [9] CURZON (G. M.). *Persia and Persian question*, Londres, 1892.
- [10] FIELD (H.). *Contribution to the anthropology of Iran*, Chicago, 1939.
- [11] GROUSSET (R.). *L'empire des steppes*. Payot, édit., 1939.
- [12] KHÉRUMIAN (R.). *Génétique et anthropologie des groupes sanguins*. Vigot, édit., 1951.
- [13] MOTEN (A. N.) et STEWART (G. T.). *Brit. J. Haem.*, 1956, **2**, 61.
- [14] BOYD (W. C.) et BOYD (L. G.). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1954, **12**, 393.
- [15] CHAUDHRI (I. M.), IKIN (E. W.), MOURANT (A. E.) et WALHY (J. A. E.). *Man*, 1952, **52**, 168.
- [16] MARANJIAN (G.). Communication personnelle.

ÉTUDE DES FORMES L DES BACTERIES APPARUES SPONTANÉMENT *IN VIVO*

I. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET POUVOIR PATHOGÈNE

par J. VIGOUROUX et G. HANNOUN (*).

(Institut Pasteur. Laboratoire de M^{lle} CATEIGNE.
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE)

On n'a jamais encore, à notre connaissance, étudié l'apparition spontanée *in vivo* de formes L de bactéries. Il est intéressant de connaître les caractères de ces formes L naturelles et surtout de les comparer à ceux des formes L obtenues artificiellement *in vitro* par l'action de la pénicilline. Nous avons étudié les formes L de *Streptococcus viridans* var. *She* (*sanguis*) obtenues dans des embryons de poulets inoculés avec du sang de lapins présentant une bactériémie expérimentale [36, 37, 38]. Après trois ou quatre jours dans l'œuf, les bactéries présentent déjà quelques changements. Il apparaît des formes bacillaires diphtéroïdes, en losange, en poire, etc. De plus, les chaînettes deviennent plus courtes (6 à 8 éléments) et les germes commencent à perdre leur colorabilité : des chaînettes présentent des formes Gram + Gram — alternées, des diplocoques sont parfois formés d'un coccus Gram+ et d'un coccus Gram — (fig. 1). On observe aussi l'apparition de petits granules.

Ces éléments de formes et de colorabilité anormales se développent avec difficulté dans les milieux de culture, même améliorés. Par la suite, la coloration par la méthode de Gram devient généralement impossible, bien que dans certains cas les cultures soient denses. Pour mettre les germes en évidence, il a fallu recourir à différentes techniques d'observation microscopique. Quand le séjour en œuf est plus prolongé, la culture *in vitro* devient impossible et pour conserver le germe nous avons dû faire des passages d'œuf à œuf. L'existence de germes difficilement colorables dans les organes de l'embryon ainsi que l'apparition de lésions sont les témoins de l'infection. A un certain moment, on peut observer le déclenchement d'une variation plus précise et plus caractéristique ; en repiquant

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1956.

cette culture plusieurs fois d'œuf en œuf et en faisant à chaque passage des cultures en bouillon additionné de facteurs de croissance, nous avons pu obtenir à nouveau une culture *in vitro*.

Dans ces conditions, nous avons observé une majorité de petites colonies blanchâtres, présentant une petite papille centrale ; il y avait également d'autres colonies un peu plus grandes, un peu plus plates, presque transparentes, à bords découpés. La coloration des premiers éléments, encore difficile, montrait un grand pléomorphisme cellulaire. Le centre contenait des petits cocci en amas ou dispersés et les bords présentaient surtout des formes cocco-bacillaires, diphtéroïdes, adossées les unes aux autres. Dans les colonies plus transparentes le polymorphisme était plus net : on y observait des cocci mal colorés, des bacilles prenant faiblement le Gram ou apparaissant comme vidés de leur substance cytoplasmique, des formes plus grandes, arrondies ou ovoïdes, globuleuses, contenant parfois une condensation centrale ou des granules isolés ou ramassés.

Ces éléments modifiés provenant du streptocoque Sbe représentent le matériel que nous avons employé pour réaliser notre travail.

Résultats.

I. — DESCRIPTION DES FORMES OBSERVÉES.

a) OBSERVATION PAR COLORATION DE GRAM. — Dans certaines cultures, faites au début de nos expériences, devenues très troubles après sept jours ou même dix jours d'incubation, et présentant un dépôt important, la coloration de Gram ne laisse rien apparaître, malgré certaines modifications apportées à la technique classique. L'étude par cette coloration ne peut donc être réalisée qu'après de multiples passages. On peut distinguer trois lignées de variants morphologiques auxquelles nous avons provisoirement attribué des lettres pour simplifier les descriptions. Si nous appelons A la forme normale en chaînettes typiques, la forme B serait peut-être celle qui s'en rapproche le plus. Elle est constituée par des amas de petits cocci, fortement serrés les uns contre les autres, ce qui leur fait perdre, dans une certaine mesure, leur forme ronde et les fait apparaître presque polygonaux. Les amas sont absolument différents de la formation en grappes du staphylocoque ; ils sont souvent reliés par de longues chaînettes de 20 à 30 éléments (fig. 2). Cette disposition est identique dans les milieux solides et liquides. Le variant C (fig. 3), qui présente la même difficulté de coloration au cours des premiers passages, est constitué par des formes diphtéroïdes mesurant approximativement 0,5 à 1 μ de longueur avec les extrémités à peu près en fuseau. La disposition, assez rare en bactériologie, est caractéristique ; on observe des groupes de 4 à 6 bacilles rangés parallèlement auxquels s'ajoutent d'autres bacilles disposés perpendiculairement aux premiers et également adossés entre eux. D'autres bacilles situés irrégulièrement

autour de ces groupes forment un amas. En général tous les petits groupes de formes diphtéroïdes présentent une disposition semblable.

Au cours des passages de variants B et C, nous avons observé fréquemment le mélange de ces deux formes et leur évolution en corps globulaires libres ou attachés à des cocci. Nous avons aussi noté quelques diplocoques de taille géante, devenus Gram — avec, les séparant, une bande de substance Gram +.

Le variant D est le plus polymorphe, mais, il y a des éléments très caractéristiques : ce sont les corps globulaires et les granules. Cependant, il y a aussi des chaînettes d'éléments ovoïdes ou piriformes, de grosse ou de petite taille, parfois vacuolisés et liés par un mince filament. A partir de ces derniers, qui présentent quelquefois une sorte de queue très fine et mal colorée, on voit se développer, surtout dans les cultures liquides, de longues ramifications se colorant faiblement au Gram avec des chaînettes de petits granules.

Description des corps globuleux. — Ces formes (fig. 4 et 5) sont généralement arrondies, mais elles sont quelquefois nettement ovales. Le plus souvent, elles ne se colorent pas au Gram mais parfois elles ont un noyau central Gram + qui les fait ressembler à un lymphocyte ou à un globule rouge de poule. On note également de rares formes amiboïdes avec un noyau central. On distingue généralement au sein de la substance Gram —, un ou plusieurs petits granules Gram + contrastant nettement. Il existe aussi des formes globuleuses géantes nucléées entourées de petites formations arrondies attachées par de minces filaments ; certaines d'entre elles sont nucléées. Les corps globuleux les plus grands présentent une ou plusieurs vacuoles avec, parfois, de fins granules gris de différentes tailles. Les granules (fig. 6) sont d'abord très petits, tout à fait ronds, Gram + et de taille uniforme. Ils sont toujours réfringents. A la limite de la visibilité, ils peuvent être Gram — ou faiblement violets. Puis au cours de l'évolution, ils peuvent perdre leur forme ronde. Les granules sont présents dans tous les variants, mais ils sont abondants spécialement dans la forme D, en association avec les corps globuleux. Une étude spéciale en sera décrite par ailleurs.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Gr. 1560. Premiers stades des modifications bactériennes : cocci gonflés, formes allongées, mélange des éléments Gram + et Gram —, multiplication désordonnée.

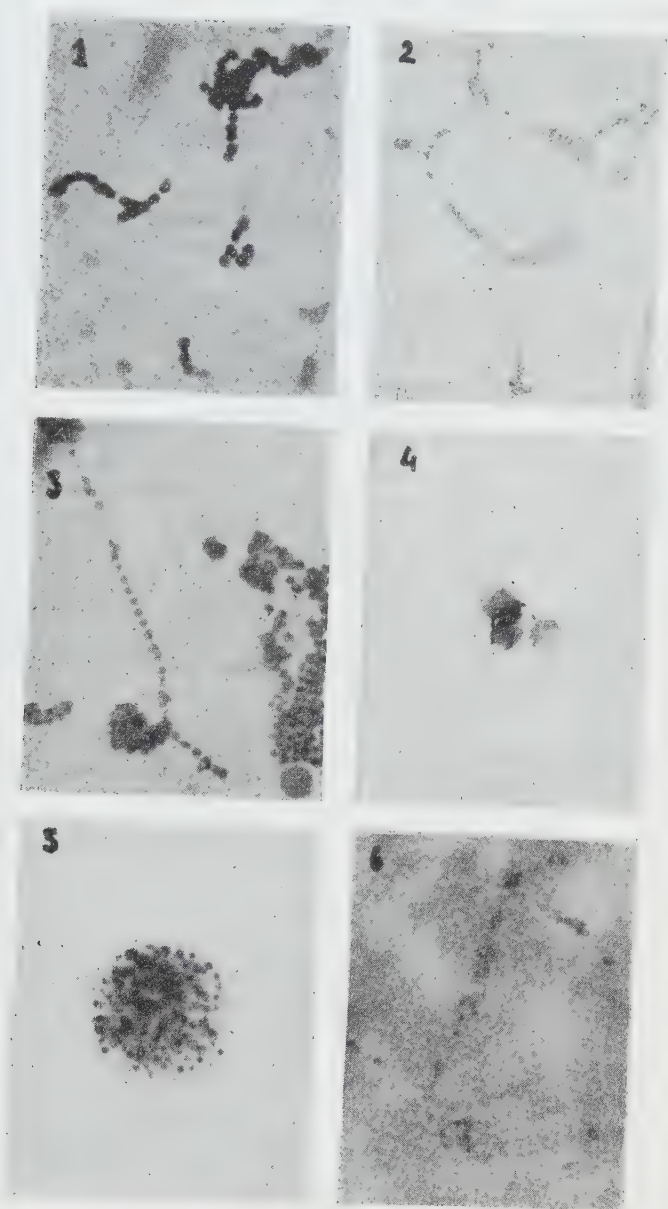
FIG. 2. — Gr. 860. Cocci en amas, liés par de longues chaînettes.

FIG. 3. — Gr. 1560. Cocci allongés et en amas. Disposition en palissade.
Un corps globuleux et petits granules.

FIG. 4. — Gr. 1200. Trois corps globuleux, dont deux avec granules, liés par une chaînette formée de cocci Gram + et Gram —. L'autre donne naissance à des chaînettes de cocci.

FIG. 5. — Gr. 1200. Un corps globuleux géant rempli de granules de toutes tailles.

FIG. 6. — Gr. 1560. Réseaux et chaînettes de petits granules.



b) OBSERVATION EN CONTRASTE DE PHASE. — C'est la méthode d'élection pour l'étude des formes L. Les corps globuleux se présentent comme des corps arrondis ou ovoïdes avec parfois une zone plus dense au centre. Dans certains cas ils sont entourés de formations arrondies satellites plus petites, analogues à ce que nous avons décrit par l'étude de la coloration de Gram. Les filaments unissant ces différentes formes sont ici encore nettement apparents et ne semblent pas rigides. Les satellites les plus petits peuvent être dotés de mouvements rapides à la périphérie de la formation centrale. Les coques et les formes diphtéroïdes montrent des déformations transitoires de leur corps. Les granules sont arrondis, de différentes tailles, parfois en groupes ou en courtes chaînettes ou isolés.

Au microscope en contraste de phase, on observe avec une très grande fréquence le phénomène de réfringence, soit pour les variants, soit pour les granules. La réfringence est parfois plus intense autour des corps globuleux immobiles et déformés qui semblent morts et en voie de destruction.

c) OBSERVATIONS PAR LA COLORATION A LA THIONINE PHÉNIQUÉE ET AU MAY-GRUNWALD-GIEMSA. — L'observation des variants B et C après coloration de Gram est intéressante. Mais si l'on utilise la coloration de May-Grünwald-Giemsa, on note généralement que les diplocoques sont formés de deux éléments semblant vides à l'exception d'un granule violet excentrique, paraissant entouré d'une membrane à peine perceptible. On retrouve parfois un granule analogue à l'extrémité des formes bacillaires, le reste du germe étant moins coloré ou semblant vide. Le variant D ne se colore pratiquement pas, à l'exception de quelques formes bacillaires ou filamenteuses. Il est très difficile de retrouver les formes géantes, les filaments renflés ou les chaînettes d'éléments vacuolisés.

La coloration à la thionine phéniquée permet de bien observer les variants B et C même au cours du stade où ils sont difficilement colorables par le Gram. Elle montre aussi très bien les masses de substance amorphe que l'on voit parfois sortir de la bactérie ou qui en sont déjà séparées.

II. — ETUDE DES CULTURES : ÉVOLUTION DES VARIANTS B, C et D.

Au cours des repiquages, on note une évolution extrêmement complexe et même parfois d'allure désordonnée, des divers types de variants les uns vers les autres. En général, nous avons observé que les milieux solides favorisaient la stabilisation des formes ensemencées. Par contre, en milieux liquides, améliorés ou non, les germes présentent une aptitude très nette à se transformer : c'est ainsi qu'en repiquant toutes les quarante-huit heures un variant en milieu liquide, on observe généralement l'apparition de toutes les autres formes avec, cependant, prédominance du variant primitif. Le variant B se transforme en variant C avec une certaine fréquence, mais dans certains cas, nous avons eu l'impression que la forme C provenait directement de la souche originale, n'ayant pas observé le passage par B. Cependant, il est possible que le stade B n'ait eu qu'une courte durée et ait échappé à l'observation. Les cultures des variants B et C, en milieu liquide, après

quarante-huit heures d'incubation et même à la température ambiante commencent à donner des corps globuleux. Ces éléments peuvent se présenter comme une masse arrondie sans structure spéciale ou avec les caractéristiques décrites précédemment. Des granules apparaissent en nombre croissant. La présence des granules est un caractère assez constant des cultures en évolution : ces éléments, correspondant sans doute aux unités minima reproductrices de Klieneberger Nobel, sont libres ou inclus dans les formes globuleuses. Ils sont de taille variable selon le stade d'évolution de la culture. Les plus gros sont de la taille d'une bactérie normale et les plus petits observés jusqu'ici de l'ordre de grandeur de la limite de visibilité au microscope optique avec toutes les tailles intermédiaires. Certaines cultures sur milieu solide, composées presque exclusivement de corps globuleux, ont été émulsionnées en eau physiologique et maintenues à + 4° pendant plus de quinze jours sans perdre leurs caractères morphologiques.

Certains aspects caractéristiques fréquemment observés permettent de concevoir le mode d'apparition des corps globuleux. Dans certaines chaînettes de streptocoques d'apparence déjà anormale, on voit l'indépendance des éléments s'atténuer et on n'a plus, bientôt, qu'un élément bacillaire uniformément Gram + ; puis le centre de cet élément bacillaire perd sa colorabilité alors que se forme à son niveau un petit bourgeon réfringent. Par la suite, la forme bacillaire n'a plus que ses deux extrémités Gram + et tout le centre est faiblement Gram —. En même temps, le bourgeon latéral augmente de taille et de réfringence et prend l'apparence d'un corps globuleux. Dans quelques cas, à partir du variant C se forme, au lieu d'un bourgeon, une sorte de petit cristal quadrangulaire, fortement réfringent qui reste parfois attaché à la forme diphtéroïde mais peut s'en séparer. Par la suite, on voit dans la culture des éléments coccobacillaires donnant l'impression d'avoir laissé échapper leur contenu cytoplasmique, la membrane restant seule, très floue et difficilement colorable. A ce moment, le milieu de culture contient de très abondants corps globuleux et l'on voit sur les préparations colorées par le Gram des zones roses ou faiblement violettes correspondant vraisemblablement à une substance amorphe, peut être gélatineuse, qui se dépose soit en chapelets de gouttes, soit en filaments étirés. Cette substance donne parfois l'impression d'être vacuolisée, avec le même caractère de vacuolisation que les corps globuleux. Il n'est pas rare, après soixante-douze heures de culture, de voir des cristaux minces et allongés, jaunes à la coloration de Gram et qui, en contraste de phase ne montrent pas de structure spéciale. A l'observation entre lame et lamelle, au bleu de méthylène, ils semblent quelquefois contenir des granules.

Dans les cultures en milieu liquide laissées à la température ambiante, tous les variants reviennent à la phase originale en sept à dix jours. Certains tubes contenant des variants typiques furent laissés soixante jours à la température du laboratoire : on peut observer au bout de ce délai des formes normales typiques avec chaînettes et diplocoques. Certains autres tubes de formes L, par contre, s'étaient stabilisés à la forme B ou C. Le repiquage de ces cultures âgées resta négatif.

Nous donnons le nom de « phase de retour » à ce stade où nous assistons à la réapparition des formes normales typiques, avec disparition des corps globuleux, des granules et des autres éléments anormaux. Dans

b) Epreuve *in vivo* : La dose minima protectrice est déterminée sur embryon de poulet inoculé par voie vitelline. Avec 0,25 U.O. par millilitre, il n'y a pas de protection ; avec 1 U.O. 50 p. 100 de protection ; avec 5 ou 10 U. O., 100 p. 100 de protection. La concentration protectrice à 50 p. 100 est de 1 unité par millilitre.

2° VARIANTE B, C, D. — a) Epreuve *in vitro*. La difficulté de culture empêche l'emploi de la méthode standard. On recherche donc plutôt la concentration bactéricide minima en utilisant l'embryon de poulet pour tester les mélanges germes-pénicilline. Le contact de vingt-quatre heures avec 10 U. O. par millilitre n'inactive pas les variants.

b) Epreuve *in vivo*. Avec 10 U. O. par millilitre, on n'observe aucune protection chez l'embryon de poulet.

Discussion.

Les anomalies morphologiques, les altérations de colorabilité et même les formes filtrantes des bactéries sont connues depuis longtemps. E. Cesari, en 1912 [3], avait observé chez une bactérie anaérobie des éléments arrondis et globuleux pleins de petits granules, correspondant à ce que l'on appelle maintenant « corps globuleux ». En 1924, P. Hauduroy [9] décrivait d'intéressantes expériences de désintégration bactérienne sous l'action des phages. Les formes filtrantes obtenues peuvent être maintenant comparées à celles du cycle L. A.-R. Prévot, en 1933 [24], réussissait la filtration de cocci anaérobies et interprétait les formes filtrables comme une phase du cycle évolutif de ces germes *in vivo* ; il faisait remarquer que, puisque l'on ignore les phases de la multiplication des bactéries dans leur milieu naturel, on ne peut affirmer que la division directe soit le seul mode de reproduction. F. Nitti, en 1923 [23] décrivait de profondes altérations des germes isolés de cas de bronchite chronique et d'asthme. Vigouroux, en 1943 [30], dans une étude de 50 souches de *Klebsiella*, décrivait différentes anomalies spontanées des colonies et des germes. L'un de ces variants, stable, a toutes les caractéristiques des formes L.

A la suite de l'emploi des antibiotiques, on observe de plus en plus fréquemment ces variations. Vigouroux et coll. [33] décrivaient en 1949 l'apparition, chez les *Salmonella* et des *Klebsiella* soumises à l'action de doses sublétales d'antibiotiques, d'éléments géants ou filamenteux, en fuseau, microsphéroïdaux (avec des granules), d'autres d'aspect flou, apparaissant dépourvus de contenu cellulaire. Certains de ces éléments, très résistants aux antibiotiques (sensibilité passée de 4 à 100 000 μ g de strepto-

mycine par millilitre), à la morphologie totalement modifiée, possédaient des caractères de fermentation atypiques.

Mais c'est Klieneberger-Nobel, en 1935 [11 à 14] qui a fait une étude approfondie de ces formes et des organismes de la pleuropneumonie (OPP) et a donné aux premières le nom de formes L (Lister). Ensuite de nombreux travaux furent réalisés. Dienes [4, 5], C. Levaditi et coll. [16, 17], Findlay [6], Grasset et Bonifas [7], Tulasne [27, 28, 29], Minck [19, 20], Jitova et coll. [10].

Avant de discuter le problème de l'origine de ces formes, nous voulons préciser notre pensée sur leur signification générale. Nous croyons que leur existence et leur découverte revêtent une très grande importance du point de vue biologique et médical. Nous connaissons déjà, en partie, leurs caractéristiques métaboliques, leurs changements biochimiques par rapport aux bactéries normales, leur réversibilité vers les formes normales, leur transformation en corpuscules submicroscopiques, vivants, filtrables, on parle de leurs relations possibles avec les OPP et avec les virus, et cependant leur étude est encore à un stade préliminaire.

En ce qui concerne leur importance médicale, nous croyons que le rôle des formes L dans la pathologie humaine est un nouveau champ encore peu exploré et que ce champ s'élargit avec l'application intensive des antibiotiques. La sélection des formes résistantes ou la modification défensive des formes sensibles rend de plus en plus fréquente l'apparition de ces éléments. Il est très possible que certaines maladies ou certaines complications pour lesquelles les cultures sont négatives, bien que l'affection soit probablement de caractère microbien, puissent s'expliquer par ce phénomène de modification ou désintégration bactérienne. Dans les maladies comme l'endocardite lente dans laquelle on décrit des stades abactériens et même des « endocardites abactériennes » (endocardite de Libman-Sack) on pourrait envisager le rôle possible d'une phase L ou granulaire du streptocoque. Dans ce sens, il faut rappeler le grand polymorphisme des germes isolés dans cette maladie. Dans des observations personnelles, Vigouroux et coll. [35] (1947 et 1951) ont signalé l'existence, dans des cas d'endocardite, de bactéries presque impossibles à colorer, avec grand pléomorphisme, difficiles à cultiver et à classer d'après la systématique classique bactériologique. Bien que peu de publications en fassent état (Nativelle [22], Carrère et Roux [2]), ce pléomorphisme est connu de beaucoup de bactériologistes ayant l'expérience des hémocultures dans l'endocardite lente (communications personnelles de Levaditi et Legroux, Enjalbert, Vigouroux, etc.). L'existence de la phase granulaire du bacille de Koch, comme l'isolement de formes L dans les sécrétions uréthrales apparemment abactériennes (Tulasne [28], Moustardier [21]), et les élé-

ments anormaux trouvés dans l'endocardite lente nous indiquent que dans ce champ de la pathologie humaine, il reste beaucoup de points obscurs qu'il faut étudier, en ayant présente à l'esprit l'existence des formes L et de la phase granulaire.

L'origine et l'apparition des formes L a été attribuée à l'action expérimentale des agents nocifs tels que les substances chimiques diverses, les antibiotiques, ou les agents physiques (chaleur, lumière etc...). On a dit également que certaines bactéries sont normalement capables de développer des formes L. Klieneberger-Nobel pense que les unités minima reproductrices et les corps globuleux font partie d'un cycle sexuel des bactéries. Tulasne ne partage pas cette opinion. Cependant, ces éléments se multiplient certainement d'une façon distincte de la multiplication normale et n'apparaissent qu'à la faveur d'une ambiance hostile répondant seulement à la nécessité d'une défense et du maintien de l'espèce.

On sait qu'il existe dans une population normale de bactéries quelquefois un petit nombre d'individus organiquement plus faibles, pour lesquels les conditions du milieu ambiant normal ne sont pas suffisantes. Ce petit nombre de bactéries serait capable d'évoluer vers des formes semblables aux formes L. Mais le point le plus important est que les bactéries normales, dans des circonstances défavorables, soit physiques (rayonnements, lumière), soit chimiques (action de substances nocives ou d'antibiotiques), soit biologiques (dans un organisme vivant), évoluent en totalité vers les formes L. La forme originale est alors pratiquement perdue et toute la population bactérienne se présente sous les divers variants de la forme L. De plus, ces formes peuvent se fixer et se maintenir comme telles.

En ce qui concerne le rapport entre les formes L et les OPP, il semble qu'il n'y ait pas encore d'accord complet. Beaucoup d'auteurs [27] identifient les deux groupes, alors que d'autres [44] les considèrent comme distincts.

A propos des différentes formes qui se présentent dans la phase L, les descriptions des différents auteurs coïncident presque exactement et nos observations sont concordantes. Minck a décrit très complètement la morphologie et le groupement de ces éléments. Les cocci qui perdent leur disposition primitive en se groupant en amas serrés les uns contre les autres, l'apparition des formes cocco-bacillaires en palissades irrégulières se disposant quelquefois perpendiculairement les unes aux autres, l'existence de granulations filtrables, enfin les formes globuleuses associées à d'autres éléments anormaux, piriformes, filamenteux etc. correspondent exactement à ce que nous avons observé au cours du présent travail.

Nous avons cependant noté quelques différences par rapport

aux descriptions de Minck et aussi quelques faits supplémentaires, surtout en ce qui concerne l'évolution des variants. Nous avons observé fréquemment le gonflement de la bactérie avant la naissance du corps globuleux ; cependant, on peut voir une bactérie de taille normale donner la forme géante. Parfois deux bactéries ou plus (5 à 6) peuvent s'associer pour donner la forme géante. Autrement dit, il n'est pas indispensable que la bactérie subisse un gonflement préliminaire comme l'assurent plusieurs auteurs. Il semble aussi que lorsque la formation du corps globuleux s'effectue à une extrémité de la bactérie, la transformation ne puisse se faire : la membrane se déchire, et la substance cytoplasmique s'écoule à l'extérieur. La coloration de Giemsa nous a permis d'observer des bactéries qui ne paraîtraient constituées que de la membrane protoplasmique, contenant un petit point bleu intense à chaque extrémité, et donnant l'impression d'un corps cellulaire vide à l'exception du noyau. A la coloration de Gram, ces bactéries se colorent en rose faible (Gram —) alors qu'on voit aux extrémités un point Gram + intensément coloré. Le contraste de phase montre nettement la membrane bien formée, avec un point plus dense à une extrémité.

Il faut insister sur les observations faites au microscope en contraste de phase montrant le phénomène de réfringence, présent dans la majorité des variants et plus spécialement dans les formes L et les corps globuleux. Ce fait est également signalé par Bommer [4]. Cette réfringence s'observe non seulement dans les corps globuleux intacts, mais aussi dans les éléments déformés qui donnent l'impression d'être des débris de corps globuleux. L'acquisition de cette propriété correspond probablement à des modifications biochimiques, qui sont peut-être du même ordre que celles décrites par Tulasne.

Un autre fait observé très nettement au microscope en contraste de phase est la reproduction par germination des corps globuleux. Il faut ajouter à l'évolution classique décrite par Tulasne, Klieneberger-Nobel, Minck, Bommer, etc., la formation de multiples petits corps globuleux satellites autour de certains corps globuleux, auxquels ils sont unis par un mince filament. Quelques-uns de ces corps globuleux-fils ont une condensation centrale rappelant un noyau, alors que d'autres, plus petits, sont doués de mouvement, sans pouvoir s'éloigner à cause du filament qui les rattache. La dissolution brusque des corps globuleux nous a parfois surpris mais elle a déjà été signalée par Bommer [4]. Il est intéressant de noter l'observation de Dienes qui, repiquant les corps globuleux sur gélose, obtient de petits granules diphtéroïdes qui ne donnent jamais de colonies bactériennes et ne sont pas repiquables. Nous devons, par contre, remarquer la stabilité de notre variant C qui, maintenu sur gélose au sang à la température ambiante plus de

quarante jours, n'a pas subi de modifications morphologiques et fut repiqué facilement.

Les corps globuleux, qui peuvent, comme nous l'avons exposé, se former à partir de n'importe quelle phase de la forme L, sont parfois traversés par une sorte de cristal jaune, mince et long. Nous avons fréquemment trouvé ce dernier élément dans les cultures, au microscope en contraste de phase ; il montre une structure simple et fortement réfringente. Quelquefois, on voit, adossées à cet élément, des petites masses formées d'une substance vacuolaire. Nous ne pouvons pas en faire l'interprétation, mais nous attirons l'attention sur la fréquence de ces éléments dans les variants et sur leur absence dans la culture de la souche originale.

Le pouvoir pathogène des variants se manifeste aussi sur l'embryon de poulet, et bien que leur action ne soit pas aussi intense que celle de la souche originale, les lésions impliquent également les endothéliums vasculaires. Nos observations sur le lapin sont tout à fait comparables aux résultats de Minck [49] malgré la différence du germe utilisé. Les trois lignées de variants, inoculées au lapin (y compris les corps globuleux purs), parallèlement par voies intradermique et sous-cutanée, ont donné lieu à une réaction locale caractéristique. Par contre, la souche originale, inoculée, à la même concentration aux mêmes lapins, n'a donné aucun résultat. Ceci concorde avec les travaux de Minck, à la différence que nous trouvons de rares bactéries sur les frottis de pus et que les cultures ont toujours été positives ainsi que l'inoculation à l'embryon de poulet. Dans cette substance existait la phase de retour qui, ensemencée en bouillon amélioré, donnait la forme originale primitive.

La phase de retour est signalée aussi par d'autres auteurs soit *in vitro* (Hauduroy, Liebermeister [48], Tulasne) soit *in vivo* (Silberstein [25]). On a pu noter une augmentation de la vitesse du retour par les facteurs de croissance.

L'étude immunologique nous a montré que l'antisérum préparé sur le lapin contre la souche originale, agglutine intensément celle-ci et faiblement les variants. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Topolnik [26] qui a observé la perte complète de l'agglutinabilité des formes L de *V. cholera suis*.

Quant à la résistance aux antibiotiques, nous voulons souligner la différence de sensibilité à la pénicilline, de la souche normale et de ses variants. Ces derniers se sont montrés beaucoup plus résistants *in vitro* et *in vivo*. Il est intéressant de remarquer, bien que *S. viridans* soit, en général, très sensible aux antibiotiques [31, 32, 34], que l'on a un pourcentage élevé d'échecs dans l'endocardite lente, avec le traitement par les antibiotiques. La présence

de streptocoques en forme L chez ces malades expliquerait très facilement ces échecs.

Les résultats de la filtration de cultures L sur bougie L3, l'observation de granules purs, leur évolution, leur pouvoir pathogène etc. seront décrits dans un travail séparé.

Une notion intéressante se dégage de ces comparaisons entre notre travail et les observations déjà publiées. C'est que des analogies très profondes apparaissent entre les formes L de germes aussi différents que le sont par exemple un streptocoque et un *Proteus* ou une *Salmonella*. En effet, les aspects morphologiques, les caractères de culture, de colorabilité, le pouvoir pathogène sont pratiquement impossibles à différencier. Par contre, le variant possède des caractères distincts du germe original, pas toujours d'ailleurs par perte, mais souvent par l'apparition de nouvelles propriétés. Ce n'est qu'à la phase de retour que le germe retrouve sa spécificité : les formes L sont des phases ayant perdu leur spécificité pour en retrouver une autre, laquelle est commune à toutes les formes L connues. Ce phénomène de « convergence » nous semble particulièrement important, aussi bien du point de vue biologique, qu'en ce qui concerne ses implications en pathologie humaine.

A propos de la possibilité de transformation des granules en virus, conçue par Klieneberger-Nobel et développée dans une intéressante hypothèse par Tulasne, nous la considérons avec le plus grand intérêt et nous y consacrons certaines expériences.

Le problème des formes L est très complexe et beaucoup de points restent obscurs : dans l'état actuel de nos connaissances on ne peut proposer de limites strictes ni d'interprétations absolues. Nous avons là un champ très vaste qui laisse place à de grands espoirs.

RÉSUMÉ.

A partir de l'infection d'embryons de poulet par *Streptococcus viridans*, var. Sbe, isolé d'endocardite lente, on observe le déclenchement spontané d'une évolution de la bactérie vers les formes L. L'observation microscopique a été faite par les colorations de Gram, de May-Grunewald-Giemsa, de la thionine phéniquée, ainsi qu'en contraste de phase.

On observe des éléments en amas, coccoïdes ou coccobacillaires, des corps globuleux et des granules, qui concordent exactement avec les formes décrites par de nombreux auteurs.

L'étude de l'évolution des différents variants est effectuée en milieux solide et liquide, simple ou amélioré avec facteurs de croissance, liquide d'ascite, etc.

Les différents variants sont pathogènes pour l'embryon de poulet et le lapin.

La reproduction par germination des corps globuleux est confirmée à l'examen microscopique en contraste de phase, et la phase de retour est observée dans tous les variants, souvent en milieu de culture liquide et toujours dans le pus obtenu dans la peau du lapin.

L'étude de la filtration sur bougie L3 des différents variants, leur évolution, leur pouvoir pathogène et leur retour à la forme originale seront l'objet d'une publication ultérieure.

SUMMARY.

Streptococcus viridans var. Sbe isolated from cases of endocarditis lenta and inoculated into chick-embryo, spontaneously develops L forms.

Cocci-like or coccobacillary elements, isolated or agglutinated, large bodies and granules are observed, similar to the forms already described by other authors.

The evolution of the variants is studied in different media: solid, liquid, usual, or improved with growth factors, ascitic fluid, etc.

The different variants are pathogenic for the chick embryo and for rabbits.

Examination with phase microscope has allowed to confirm the reproduction by germination of large bodies. All the variants regain the usual form, often in liquid media and always in the pus induced in rabbit's skin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOMMER (W.). *Zeitschr. Hyg. Infekt. Krankh.*, 1952, **136**, 510.
- [2] CARRÈRE (L.) et ROUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 220.
- [3] CESARI (E.) et ALLEAUX (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, **26**, 625.
- [4] DIENES (L.). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, **39**, 365.
- [5] DIENES (L.) et WEINBERGER (H. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 245.
- [6] FINDLAY (G.), KLIENEGER (E.), MAC CALLUM (F.) et MACKENZIE (R.). *Lancet*, 1938, 1511.
- [7] GRASSET (E.) et BONIFAS (V.). *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1955, **18**, 1074.
- [8] HANNOUN (C.) et VIGOUROUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 670.
- [9] HAUDUROY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **101**, 1209.
- [10] JITOVA (E. I.), IVANOVA (N. A.) et TARANIOUH (Z. E.). *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 1955, **10**, 32.
- [11] KLIENEGER (E.). *J. Path. Bact.*, 1935, **40**, 93.
- [12] KLIENEGER-NOBEL (E. J.). *Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 525.
- [13] KLIENEGER-NOBEL (E.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 77.
- [14] KLIENEGER-NOBEL (E.). *Problèmes de Virologie*, 1953 (Masson, éditeur).

- [15] LANCEFIELD (R.). *J. Exp. Med.*, 1933, **57**, 571.
- [16] LEVADITI (C.) et HENRY (J.). *Rev. Immunol.*, 1948, **12**, 193.
- [17] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et HENRY-EVENO (J.). *Bull. Acad. Med.*, 1950, **135**, 369.
- [18] LIEBERMEISTER. *Zentralbl. Bakt.*, 1953, **160**, 250.
- [19] MINCK (R.) et FRUHLING (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 2091.
- [20] MINCK (R.). *Rev. Immunol.*, 1955, **19**, 86.
- [21] MOUSTARDIER (J.), BRISOU (M.) et PERREY (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 520.
- [22] NATIVELLE (R.). *Sem. Hôp. Paris*, 1954, **30**, B. 328.
- [23] NITTI (F.). *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, 676.
- [24] PRÉVOT (A.-R.). *Ann. des Sc. Natur.*, 1933, **70**, 234.
- [25] SILBERSTEIN. *Schweiz. Zeitschr. allg. Path. Bakt.*, 1953, **16**, 739.
- [26] TOPOLNIK (E.). *Veter. Archiv.*, 1953, **23**, 145.
- [27] TULASNE (R.). *Nature*, 1951, **164**, 876.
- [28] TULASNE (R.), MINCK (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, - 1953, **85**, 525.
- [29] TULASNE (R.). *Biol. Méd.*, 1955, **45**, 391.
- [30] VIGOUROUX (J.). *Thèse*, 1943 (Chili).
- [31] VIGOUROUX (J.) et LEYTON (G.). *Rev. Med. Chili.*, 20 mai 1946.
- [32] VIGOUROUX (J.) et LEYTON (G.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 605.
- [33] VIGOUROUX (J.) et SANHUESA (L.). *Soc. Med. (Chili)*, 15 décembre 1949.
- [34] VIGOUROUX (J.) et DOBRY (M.). *Rev. Dental. (Chili)*, 1950, **41**, 225.
- [35] VIGOUROUX (J.). *Jor. Med. Valpso. (Chili)*, 1953.
- [36] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *C. R. Acad. Sc.*, 1956, **242**, 2603.
- [37] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *I^{er} Congrès Int. Path. Inf.*, 1956 (Lyon, France).
- [38] WASHBURN (M. R.), WHITE (J. C.) et NIVEN (C. F.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 723.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 4 Octobre 1956.

Présidence de M. PRÉVOT.

NÉCROLOGIE

ÉMILE CÉSARI

(1876-1956)

Né à Nice en 1876, Emile Césari a succombé cette année à Grasse, où il s'était retiré. Il fut élève de l'Ecole vétérinaire d'Alfort et devait retrouver à l'Institut Pasteur ses amis, Truche, Forgeot, Alleaux, dans la collaboration scientifique. Sa carrière a eu lieu en même temps à l'Inspection vétérinaire de Paris et du département de la Seine et à l'Institut Pasteur, où il s'est adonné à la recherche durant de longues années. Elève de Borrel, puis de Maurice Nicolle, il professait une admiration profonde pour les qualités intellectuelles de ce dernier. Il fut conduit à étudier les sujets les plus variés de la microbiologie humaine et animale et de la physiologie : bacilles de Schmorl et de Preisz-Nocard, bacille morveux, vibron septique et *Cl. chauvoei*, staphylocoques, streptocoques, levures des saucissons, toxines et antitoxines, ricine, hémolysines, venins et sérums antivenimeux, antigènes et anticorps, virulence, lipoïdes, phagocytose. Sa dernière publication (*Bull. Acad. vétér. France*, 28, 373) était destinée à rappeler que, dès 1913, il avait émis l'idée de mesurer la vitesse de sédimentation des hématies et décrit (*Rev. gén. Méd. vétér.*, 15 novembre 1913, n° 262) une technique de l'épreuve applicable au cheval. Les données essentielles de cette technique constituent le principe de la méthode ultérieurement pratiquée chez l'homme.

Dans tous ses travaux, Césari s'est toujours appliqué à définir avec précision les faits observés, naturels ou expérimentaux, faisant preuve d'un remarquable esprit critique et d'une grande probité. Il laisse à ceux qui l'ont connu le souvenir de ses éminentes qualités intellectuelles et morales.

L. C.

COMMUNICATIONS

UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE
DES LACS DU RUWENZORI : *INFLABILIS LACUSTRIS* n. sp.

par A.-R. PRÉVOT, H. THOUVENOT, M. PATRIGALLA et R. SILLIOC.

(*Institut Pasteur, Service des Anaérobies*
et Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge.)

INTRODUCTION.

Au cours d'une mission d'exploration aérienne du Massif du Ruwenzori (Congo Belge) qui présente des sommets inexplorés de plus de 5 000 m d'altitude, les photographies prises d'avion révélèrent des lacs de haute montagne jusque-là inconnus.

L'Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge ayant décidé d'organiser une expédition à buts multiples (géologie, géodésie, glaciologie, cartographie, physique du globe) dans ces régions où jamais l'homme n'avait pénétré, l'Institut Pasteur fut invité à participer à cette exploration en vue d'y faire des prélèvements de terre, d'eau et de sédiments pour en étudier la microflore bactérienne, fongique et alguale. C'est ainsi que le Dr H. Mollaret se joignit au chef de l'expédition, J. de Heinzelin, et rapporta en France 300 échantillons dont l'étude fut aussitôt entreprise par plusieurs laboratoires : Mycologie au Muséum d'Histoire Naturelle, Algologie au Centre d'Hydrologie de Gif-sur-Yvette, Microbiologie du Sol et Anaérobies à l'Institut Pasteur.

En ce qui concerne les bactéries anaérobies, on sait l'intérêt de telles recherches : inventaire de la nature, espèces nouvelles, écologie et surtout étude des bactéries des espaces vierges où l'homme n'a jamais pénétré.

Sur ce dernier point, l'un de nous [1] avait déjà tiré de ses recherches antérieures la notion nouvelle de microflore originelle. Il était intéressant d'ajouter aux notions déjà acquises le résultat de l'étude des lacs de haute montagne de l'équateur africain. Un mémoire d'ensemble donnera ultérieurement les détails de cette étude. Nous publions ici la description d'une espèce nouvelle des lacs du Ruwenzori, dont sept souches ont été isolées dans les échantillons étudiés.

HABITAT. — La souche 17/44 A a été isolée d'un prélèvement fait le 12 février 1956 dans les sédiments profonds du lac Catherine (altitude, 3 900 m ; température de l'eau, 6°1 ; pH de l'eau, 5). Sur les rives de ce lac croissent uniquement des herbes et des seneçons. La profondeur maximum est de 10 m. Aucun poisson ni autre animal n'y a été observé. Les prélèvements ont été faits au carottier stérilisé extemporanément. L'échantillon est arrivé à l'Institut Pasteur en mars et

gardé à la glacière. L'étude a commencé le 31 mai 1956. La densité microbienne était très marquée. L'espèce étudiée y pullulait à l'état pur.

Les souches O633 B et O633 C ont été isolées dans les sédiments prélevés à l'embouchure du torrent alimentant le lac Marion (altitude, 3 685 m ; température, 10°) ; flore : mousse, seneçons, alchémilles, immortelles ; faune : damans, léopards, canards ; prélèvements faits le 21 janvier 1956. Etude entreprise en juillet 1956. Ces deux souches étaient abondantes dans cet échantillon qui renfermait en outre *W. perfringens*.

La souche 0943 B a été isolée de sédiments superficiels d'une petite grève sableuse du lac de la Lune (point D) le 24 janvier 1954 ; altitude, 3 900 m ; température de l'eau, 4°5 ; pH, 4,5 ; flore : mousse et seneçons ; faune : damans, léopards et chauves-souris. L'étude en a été faite en juillet 1956. La souche y voisinait avec *W. perfringens*.

Les souches 1216 B et 1216 C ont été isolées de sédiments prélevés le 10 février 1956 au point J du lac Vert, près du rivage, sous 30 cm d'eau, sur un fond d'aspect en *riffle-marks*, sédiments verts, denses et secs. Altitude, 4 035 m ; pH, 4,9 ; température, 6° ; flore : seneçons, carex et immortelles ; faune : léopards. Dans l'eau : œufs de batraciens. Elles y coexistaient avec *W. perfringens*.

La souche 18-17 a été isolée d'un prélèvement fait le 13 février 1956 dans les sédiments superficiels du lac Gris (altitude, 4 150 m ; température de l'eau, 2°6 ; pH, 4,8). Sur les rives, végétation de lichens, de petits seneçons et d'immortelles ; faune : léopards. Mêmes remarques sur le prélèvement et sa conservation. Etude entreprise le 11 juin 1956. Densité microbienne faible. Cette souche était la seule bactérie anaérobie existant dans le prélèvement. Des anaérobies facultatifs en assez grande abondance l'accompagnaient.

Ainsi ces sept souches proviennent de 5 lacs différents mais dont les deux premiers sont alimentés par les eaux du même glacier.

MORPHOLOGIE. — Bâtonnet de 2 à 4 μ sur 0,8 à 1 μ à extrémités arrondies, immobile, non cilié, non encapsulé, sporulé. Les spores sont en général rares ou invisibles sur les milieux ordinaires. Sur milieu de Ellner [2] elles sont plus abondantes et se montrent centrales ou subterminales dans les formes jeunes, libres dans les formes âgées. Coloration : Gram-positif. Certaines souches montrent des spores abondantes et visibles dans les milieux VF.

PHYSIOLOGIE. — Anaérobie strict stable. La thermorésistance est peu marquée : dix minutes à 80°, cinq minutes à 90°, une minute à 100°. Le pouvoir réducteur est très marqué : il réduit définitivement le rouge neutre et la phénosafranine et temporairement la safranine. Pas de catalase. Les cultures sont gazogènes (gaz explosif) et fétides (odeur âcre et nauséabonde).

CARACTÈRES CULTURAUX. — En gélose profonde il donne rapidement des colonies lenticulaires et du gaz. Une souche y donne des colonies oatées et très peu de gaz. En eau peptonée il donne un léger trouble. En bouillon VF glucosé le trouble est très marqué et le dépôt rapide et abondant. La gélatine n'est en général pas liquéfiée. Le lait est rapidement coagulé avec ou sans rétraction alvéolaire du caillot. Les

protéines coagulées ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fermentés par la plupart des souches : glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose, lactose, amidon et glycérol, avec forte acidification et dégagement gazeux abondant. Quelques souches n'attaquent pas le glycérol. L'une des souches réduit les nitrates en nitrites en présence de glycérol ; toutes les souches réduisent les sulfites en sulfures.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — La fermentation du bouillon VF glucosé produit une forte acidité volatile : acide acétique et butyrique pour la plupart des souches, mais certaines produisaient un acide supérieur (valérianique ou caproïque). Pas d'acide fixe. Pas d'acétoïne. Traces ou petite quantité d' SH_2 . Très grosse quantité d' NH_3 (0,5 g par litre). Amines volatiles, éthanol, cétones, aldéhydes, phénol, indole et scatole.

Le caractère biochimique important de ces sept souches est l'existence dans leur équipement enzymatique d'une uréase très active. On sait que l'uréase est relativement rare chez les anaérobies [3] et que, par conséquent, l'existence de cet enzyme chez une espèce ajoute un caractère déterminatif de haute valeur. Dans le cas de cette espèce, cette existence est d'autant plus remarquable que la source d'urée dans ces lacs sans poisson est pauvre. On sait toutefois que certains végétaux forment de l'urée. Il est probable que cet enzyme trouve son substrat dans les plantes des rives de ce lac.

POUVOIR PATHOGÈNE. — La plupart de ces souches étaient totalement dépourvues de pouvoir pathogène pour le cobaye et la souris et ne produisaient ni toxine ni hémolysine. La souche 1744 A produisait chez le cobaye, après injection intramusculaire de 2,5 cm³ de culture, un abcès qui, après ouverture à la peau et surinfection de cage, tuait l'animal en huit jours. Cette souche ne produisait pas de toxine, mais présentait une hémolysine faiblement active (0,1 cm³ de filtrat de culture de 24 heures hémolysait 0,5 cm³ de la suspension de GR de mouton au 1/20). Une autre souche produisait une nécrose locale et superficielle de la peau et était légèrement hémolytique.

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE ET DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL. — La morphologie de ces souches permet de les classer dans le genre *Inflabilis* [4]. A l'intérieur de ce genre, leurs cultures gazogènes les situent dans le groupe A, sous-groupe b non protéolytique, comprenant six espèces. Il se distingue :

d'*Inflabilis teras* qui a des dimensions plus grandes, ne coagule pas le lait, n'a pas d'uréase ;

d'*Inflabilis sanguicole* qui liquéfie la gélatine, n'est pas fétide ni uréasique ;

d'*Inflabilis barati* qui est lipidolytique, non indologène, non uréasique ;

d'*Inflabilis plagarum* qui est gélatinolytique, non indologène, non uréasique ;

d'*Inflabilis setiensis* qui ne coagule pas le lait et n'a pas d'uréase ;

d'*Inflabilis carbonei* qui a des colonies rouges, n'est ni indologène, ni uréasique.

Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle dont le caractère le plus marquant est le pouvoir uréasique et pour laquelle nous proposons le nom d'*Inflabilis lacustris* n. sp.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION. — Dans les sédiments de cinq lacs de haute montagne inexplorés du Massif du Ruwenzori ont été isolées sept souches d'une nouvelle espèce anaérobie thermorésistante, réductrice, peptolytique, glucidolytique, uréasique, ferment acéto-butyrique, sulfito-réductrice, peu ou pas pathogène, pour laquelle est proposé le nom d'*Inflabilis lacustris*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.). *La Nature*, 1952, n° 3205, 147.
- [2] ELLNER (P. D.). *J. Bact.*, 1956, **71**, 495.
- [3] HUET (M.) et CADORE (F. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 421.
- [4] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit., Masson, 1948, 134.

HÉTÉROGÉNÉITÉ DES TAUX CATALASIQUES DANS LES POPULATIONS DE BACILLES TUBERCULEUX ISONIAZIDO-RESISTANTES

par B. KREIS, E. LE JOUBIOUX et D. PARIENTE (*).

[Aide-technique M¹¹ FOURNAUD].

(Clinique de la Tuberculose de la Faculté de Médecine de Paris
[professeur Etienne BERNARD])

On sait, depuis le travail de Middlebrook [9, 10], les recherches de différents auteurs et les nôtres [1, 15], que certaines souches isoniazido-résistantes de bacilles tuberculeux se singularisent par la perte de leur activité catalasique.

Nous avons eu l'occasion de préciser ces constatations en utilisant une technique semi-quantitative de mesure de l'activité catalasique.

Cette méthode simple, inspirée en partie de celle de Peizer et Widelock [11, 12], est applicable seulement dans la zone comprise entre les taux nuls de catalase et les limites inférieures de l'activité catalasique normale des bacilles tuberculeux.

Deux ôses de culture récente de bacilles (soit 4 mg), prélevées sur milieu de Löwenstein-Jensen, sont mises en suspension dans 0,4 ml d'un tampon phosphate pH 7. On ajoute 0,2 ml de H₂O₂ à 0,3 p. 100 et on laisse en contact une heure à 4°. Après addition de 0,5 ml de SO₄H₂ normal on pratique un titrage rapide à la pipette graduée au 1/10, avec une solution de MnO₄K à 1,12 p. 1 000 (dont 11/10 de millilitre sont nécessaires pour obtenir le virage du milieu en l'absence de bacilles).

Le pourcentage de H₂O₂ décomposé dans ces conditions représente la richesse en catalase, sans lui être directement proportionnel. Il serait

(*) Travail réalisé avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène (Professeur BUGNARD) et de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

inexact de considérer, par exemple, qu'un taux de 60 p. 100 représente deux fois plus de catalase qu'un taux de 30 p. 100. Quant au taux de 100 p. 100 il signifie que l'activité catalasique dépasse le taux maximum qui peut être déterminé par cette technique et correspond à des richesses très variables.

Appliquant cette technique à 556 souches de bacilles de Koch normalement sensibles à l'isoniazide ($R < 0,1$ mg/ml), nous avons constaté que ces souches ne présentaient pas toutes la même teneur en catalase. Classées selon leur activité catalasique, elles se distribuent selon la figure 1. Celle-ci évoque une courbe de Gauss amputée de sa moitié droite, notre technique de dosage confondant toutes les souches dont l'activité égale et dépasse 100 p. 100.

Cette inégalité d'activité catalasique n'est pas seulement observée

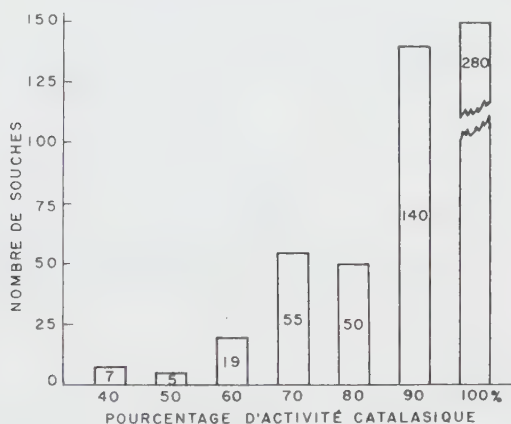


FIG. 1.

entre les diverses souches. Notre technique nous a permis d'aborder un problème qui ne semble pas, jusqu'à présent, avoir retenu l'attention des chercheurs : c'est de savoir si le taux de catalase dosé dans un poids déterminé de corps bactériens se répartit uniformément entre tous les éléments de la population microbienne, ou si les différents bacilles ont une richesse inégale en catalase.

Pour étudier cette question nous avons dissocié nos souches en colonies séparées, qui ont fait chacune l'objet d'un titrage particulier de leur catalase. Il s'agissait de souches résistantes, dont l'activité catalasique était comprise dans les limites de notre technique de dosage.

Nous avons constaté que les différentes colonies présentaient des activités catalasiques variables, le taux catalasique de la souche étant la résultante des taux individuels des différentes colonies. La distribution de ces taux mérite d'être étudiée ; dans certains cas, elle se fait selon des courbes de Gauss plus ou moins aplaties ; dans d'autres, la population se présente comme constituée de plusieurs groupements, l'un ayant par exemple une teneur élevée, l'autre une teneur nulle en

catalase (fig. 2). Dans ce cas la résistance des colonies des deux groupes est également différente.

Ces constatations présentent un certain intérêt pour expliquer la *variabilité spontanée de l'activité catalasique*. En effet, on observe souvent, lorsqu'on conserve ces souches en milieu liquide, une élévation de l'activité catalasique. Celle-ci peut s'expliquer par la multiplication plus rapide des germes les plus riches en catalase de la population

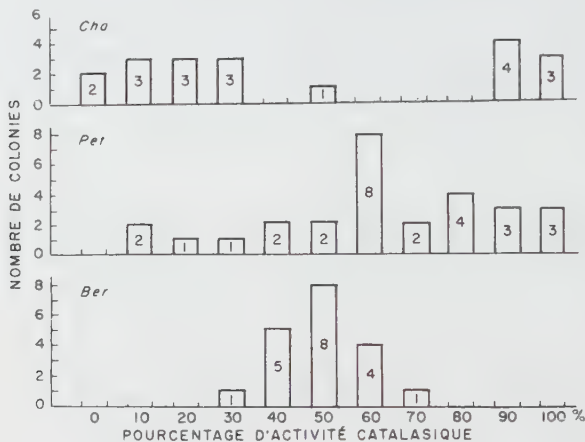


FIG. 2.

microbienne ; ce phénomène se démontre facilement en notant la date d'apparition des différentes colonies sur milieu de Löwenstein.

D'autre part, cette hétérogénéité fondamentale, qui fait que des éléments de taux catalasique élevé sont présents en petite quantité dans des souches apparemment pauvres en activité catalasique, doit être prise en considération dans l'étude du pouvoir pathogène de ces souches.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERNARD (E.), KREIS (B.) et LE JOUBIQUX (E.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1113.
- [2] BÖNICKE (R.). *Naturwiss.*, 1954, **41**, 430.
- [3] COHN (M. L.), KOVITZ (C.), ODA (U.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 661.
- [4] CROXATO (O. C.) et CETRANGOLO (A.). *Poumon et Cœur*, 1956, **12**, 51.
- [5] DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et ALIX (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 783.
- [6] GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.), VOISIN (C.) et FABRE (M.). *Rev. Tub.*, 1955, **9**, 1.
- [7] KNOX (R.), MEADOW (P. M.) et WORSSAM (A. R. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **73**, 726.
- [8] MEISSNER (G.). *Fortschr. Tuberk. Forsch.*, 1956, **7**, 52.
- [9] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.

- [10] MIDDLEBROOK (G.), COHN (M. L.) et SCHAEFFER (W. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 852.
[11] PEIZER (L. R.) et WIDELock (D.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 305.
[12] PEIZER (L. R.) et WIDELock (D.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 246.
[13] VIALIER (J.) et CAYRE (R. M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 734.
[14] VIALIER (J.) et CAYRE (R. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 373.
[15] WOLINSKY (E.), SMITH (M. M.) et STEENKEN (W.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **73**, 768.

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA* : *S. THIAROYE* (38 : eh : 1.2)

par L. et S. LE MINOR et H. DARRASSE.

(*Instituts Pasteur de Paris et Dakar*)

Cette *Salmonella* a été isolée de ganglion de porc.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — Cette bactérie ne possède pas d'uréase, ne produit pas d'indole, ne liquéfie pas la gélatine et ne cultive pas sur milieu au CNK.

Les milieux contenant les oses et alcools suivants sont acidifiés en un jour : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose. L'adonitol, le sorbose, le lactose, le saccharose, l'inositol et la salicine ne sont pas fermentés en vingt et un jours. Le milieu au glycérol de Stern vire au lilas en deux jours, le D-tartrate est fermenté en trois jours (milieu de Kauffmann). Cette *Salmonella* cultive en un jour sur milieu au citrate de sodium de Simmons. Elle produit de l'hydrogène sulfuré, réduit le rouge neutre, donne sur milieu de Clark et Lubs une réaction au rouge de méthyle positive et de Voges-Proskauer négative.

CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES. — Sur lame cette souche est agglutinée par le sérum anti-O : 38 et le sérum anti-e h. La culture sur gélose de Gard additionnée de sérum anti-e h fait apparaître une agglutination dans les sérums anti-1,2 et 2 saturés.

En tubes, elle est agglutinée à 1/3 200 dans le sérum anti-S. *inversum* (O : 38) dont le titre homologue est 1/6 400. La saturation de ce sérum par *S. thiaroye* enlève toutes les agglutinines.

La phase 1 est agglutinée à 1/25 600 (titre homologue) par un sérum anti-S. *newport* phase 1. La saturation fait baisser le titre homologue à 1/100.

La phase 2 est agglutinée à 1/25 600 par un sérum anti-S. *paratyphi* B phase 2 (1,2). Elle en sature totalement les agglutinines.

La formule de cette *Salmonella* est donc 38 : e h : 1.2. Nous remercions le Dr F. Kauffmann d'avoir bien voulu nous la confirmer.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella*, *S. thiaroye* (38 : e h : 1,2), isolé de ganglion de porc.

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA* : *SALMONELLA TUNIS* (1, 13, 23 : y : z₆)

par L. LE MINOR, M. HUET et D. DRÉAN.

(Instituts Pasteur de Paris et de Tunis)

Quatre souches de ce type ont été isolées par coproculture.

La première provient d'un enfant tunisien, né le 15 juillet 1955. Cet enfant a présenté plusieurs épisodes diarrhéiques, et, à trois reprises, le 12, 19 et 26 mars 1956, nous avons isolé de ses selles *S. brandenburg*.

A la même époque, plusieurs enfants de maisons voisines ont été infectés par la même *Salmonella*. Le 14 mai se produit une rechute de diarrhée fébrile, mais une coproculture faite à cette date est négative. Le 18 mai, nous isolons des selles la *Salmonella* que nous décrivons ici. Depuis cette date l'enfant est en bonne santé.

Nous n'avons pas retrouvé cette *Salmonella* dans l'entourage de l'enfant. Nous avons, en effet, eu l'occasion de faire plusieurs coprocultures de ses parents, sœurs et voisins, qui ont présenté une entérite peu de temps après, mais chez ceux-ci les coprocultures n'ont permis d'isoler comme bactéries pathogènes que des *Sh. flexneri* 2.

Quelques mois plus tard, le 9 et le 30 juillet 1956, nous avons eu la surprise d'isoler à nouveau le même sérotype de selles d'enfants, âgés de 7 et 2 mois, qui présentèrent tous deux une diarrhée sanglante. La quatrième souche a été isolée en octobre 1956 de selles d'un enfant présentant un syndrome entérique.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — Le bacille Gram-négatif, mobile, fait fermenter en un jour les milieux contenant les oses ou alcools suivants : xylose, arabinose, rhamnose, glucose, mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose. L'adonitol, le sorbose, le lactose, le saccharose, l'inositol et la salicine ne sont pas attaqués en vingt et un jours. Le D-tartrate de sodium (milieu de Kauffmann) est fermenté en deux jours. Cette *Salmonella* cultive sur milieu de Simmons au citrate de sodium. Elle ne possède pas d'uréase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK. Les réactions phénylpropionique et phénylpyruvique sont négatives. Elle ne produit pas d'indole, ne liquéfie pas la gélatine, produit de l'H₂S. La réaction au rouge de méthyle est positive, la réaction de Voges-Proskauer négative.

CARACTÈRES SÉROLOGIQUES. — La culture est agglutinée sur lame par les sérums anti-O : 13,22, 1,13,23, 1,2, 1,3,19 et par le sérum anti-23 saturé.

L'antigène flagellaire mis en évidence sur la culture initiale est y. La culture en présence de sérum anti-y (méthode de Sven Gard) est agglutinée par le sérum anti-z₆.

En tubes, une suspension O de cette souche est agglutinée au titre homologue (1/3 200) par notre sérum anti-1,13,23 préparé avec *S. wor-*

thington. La saturation de ce sérum par *S. tunis* enlève toutes les agglutinines.

La suspension H, phase 1, est agglutinée au titre homologue (1/19 200) par le sérum anti-y préparé avec *S. mikawasima*. Elle en sature totalement les agglutinines.

La phase 2, de même qu'une suspension de *S. kentucky*, phase 2, est agglutinée à 1/6 400 dans le sérum anti-z₆ préparé avec cette dernière *Salmonella*. *S. tunis* sature totalement les agglutinines de ce sérum.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella*, *S. tunis* (1,13,23 : y : z₆), isolé par coproculture chez quatre enfants diarrhéiques.

ACTION DE LA HYALURONIDASE SUR L'ÉVOLUTION DE LA RAGE A VIRUS DES RUES CHEZ LA SOURIS

par E.-R. BRYGOO et A. DODIN.

(Institut Pasteur de Madagascar
[directeur : J. COURDURIER])

Différents auteurs se sont intéressés à l'action de la hyaluronidase sur l'affection expérimentale due à l'inoculation du virus rabique fixe. De 1949 à 1953, R. Béquignon et ses collaborateurs, A. Bussard, R. Lamy, C. Vialat et A. Guichard [1, 2, 3, 6, 7], étudièrent les modifications de la virulence du virus rabique fixe après addition de hyaluronidase. Ils démontrèrent l'augmentation du pouvoir pathogène par voie sous-cutanée pour le cobaye et observèrent l'apparition de corps de Negri typiques. Les travaux de G. Muller [4] et de T. Rosati et L. Badiali [5] confirmèrent dans l'ensemble les modifications de la virulence du virus fixe par la hyaluronidase.

Nous avons recherché s'il ne serait pas possible, grâce à la hyaluronidase, de diminuer les délais d'observation des animaux utilisés pour le diagnostic de la rage. Dans ce but, nous avons étudié l'évolution de la rage des rues chez la souris traitée par de la hyaluronidase.

Le virus des rues utilisé venait d'être isolé à partir du bulbe d'un chien, il n'en était encore qu'à son deuxième passage chez la souris. La suspension virulente était une suspension de cerveau de souris dans de l'eau physiologique. Les souris étaient des souris blanches « suisses » pesant de 18 à 20 g.

A. INOCULATION PAR VOIE INTRACÉRÉBRALE. — Le premier obstacle auquel nous nous sommes heurtés est l'impossibilité pratique d'inoculer un produit additionné de hyaluronidase par voie intracérébrale : toutes les souris meurent de quelques minutes à une heure après l'injection.

Nous avons alors essayé d'associer à l'inoculation intracérébrale de virus une inoculation simultanée de hyaluronidase par voie intrapéritonéale. Les souris reçurent ainsi 500 unités V. S.

Il n'y eut pratiquement aucune différence dans la durée de l'évolution de la maladie entre le lot témoin et le lot traité par hyaluronidase : les dix souris de chaque lot présentèrent une mortalité groupée les 9^e et 10^e jours. Le temps de survie moyen, qui fut pour les témoins de 9,8 jours, était pour les souris traitées de 9,6 jours.

B. INOCULATION DU VIRUS PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE. — Nous avons alors essayé d'inoculer simultanément par voie intrapéritonéale la suspension de virus et la hyaluronidase en augmentant les doses de hyaluronidase.

Dans une première expérience les souris reçurent 1 000 unités V. S. de hyaluronidase par voie intrapéritonéale, en même temps que la suspension virulente inoculée par la même voie et dans la même seringue.

Pour les huit souris témoins les paralysies apparurent entre le 7^e et le 9^e jour (temps moyen d'apparition des paralysies : 8,35), la mortalité fut observée entre le 7^e et le 25^e jour (temps de survie moyen : 18,1). Les souris inoculées par voie intracérébrale avec la même suspension avaient un temps de survie moyen de 9,8 jours.

Les dix souris ayant reçu de la hyaluronidase se paralysèrent entre le 7^e et le 10^e jour (moyenne : 8,8) et moururent entre le 12^e et le 23^e jour (moyenne : 19,5).

Conclusion : pas de modification appréciable de l'évolution de la maladie.

Dans une deuxième expérience le taux de hyaluronidase fut porté à 1 500 unités V. S. par souris sans plus de succès :

Souris témoins : apparition des paralysies, 9,5 jours ; mort, 16,8 jours.

Souris traitées : apparition des paralysies, 10 jours ; mort, 17 jours.

C. CONTRÔLE HISTOLOGIQUE. — Le contrôle histologique de l'encéphale des souris utilisées au cours de ces expériences ne montra aucune modification des lésions expérimentales de rage par l'adjonction de hyaluronidase. La présence de lésions d'encéphalite et l'existence de corps de Negri furent constantes.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION. — L'addition de 1 500 unités V. S. de hyaluronidase à une suspension de virus des rues n'a pas modifié de façon sensible l'évolution de la maladie expérimentale de la souris.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEQUIGNON (R.), LAMY (R.) et VIALAT (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 283.
- [2] BEQUIGNON (R.), BESSARD (A.) et VIALAT (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 285.
- [3] BESSARD (A.), BEQUIGNON (R.) et LAMY (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 183.
- [4] MULLER (G.). *Riv. ital. Ig.*, 1950, **10**, 108.
- [5] ROSATI (T.) et BADIALI (L.). *Att. Soc. ital. Sci. veter.*, 1951, **5**, 293.
- [6] BEQUIGNON (R.) et VIALAT (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 897.
- [7] BEQUIGNON (R.), GUICHARD (A.) et VIALAT (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 263.

TEST SUR SOURIS DE L'EFFICACITÉ DU VACCIN E. V.

par E. R. BRYGOO et J. COURDURIER.

(Institut Pasteur de Madagascar)

Depuis que Sokhey [1] a montré tout l'intérêt des souris blanches pour évaluer le pouvoir protecteur d'un vaccin antipesteux, l'accord s'est fait sur la valeur de cette technique. Si l'efficacité du vaccin E. V. de Girard et Robic n'est plus à démontrer, le problème du contrôle du pouvoir vaccinant de la souche reste d'actualité. Il est en effet indispensable, avant chaque campagne de vaccination, de procéder à une expertise complète des cultures qui seront utilisées pour la production du vaccin.

Nous avons cherché à mettre au point un test sur souris afin de disposer d'une technique nous donnant des résultats chiffrés permettant des contrôles comparatifs.

TECHNIQUE. — *Animaux* : Nous utilisons des souris blanches pesant plus de 18 g et provenant d'une souche commune entretenue à l'Institut Pasteur de Madagascar. Nous avons, par des expertises antérieures, contrôlé leur haute sensibilité au bacille pesteux.

Vaccination : La vaccination consiste en une injection unique de 1/10 de millilitre par voie intrapéritonéale du vaccin pur ou d'une dilution décimale de ce vaccin. Nous en évaluons par ailleurs la teneur en germes par des dilutions et des cultures sur gélose.

Inoculation d'épreuve : L'inoculation d'épreuve a lieu sous forme d'une injection intrapéritonéale de 1/10 de millilitre d'une suspension de germes virulents à différentes dilutions décimales quinze jours après la vaccination. Une numération sur gélose permet d'évaluer le nombre de bacilles inoculés. Pour chaque lot le nombre de souris inoculées est compris entre 6 et 10.

Observation : L'observation des souris se poursuit pendant dix jours pleins. L'expérience nous a montré, en effet, que la mortalité spécifique après inoculation du bacille pesteux se produisait toujours après la trente-sixième heure et en pratique avant le huitième jour, ce qui permet d'éliminer à coup sûr la mortalité par « toxine pesteuse », la mortalité due à ce poison ayant lieu en général dans les premières vingt-quatre heures [2].

Dépouillement des résultats : Nous utilisons la méthode de Reed et Muench [3] : totaux cumulatifs et points finaux 50 p. 100, méthode devenue d'un usage courant en virologie, en particulier pour l'étude et le contrôle du vaccin antirabique.

RÉSULTATS. — Nous donnons ci-dessous le résultat de deux expériences dont le protocole fut arrêté après que différents essais préli-

minaires nous eurent montré tout l'intérêt de l'utilisation des souris dans l'étude de l'immunisation antipesteuse.

EXPÉRIENCE I. — Le vaccin utilisé pour cette expérience est une culture de quarante-huit heures à 16° de la souche E. V. sur gélose à base de peptone Chapoteau. La suspension en eau physiologique contient 5 millions de germes cultivables par millilitre (le détail des résultats est présenté dans le tableau I). Le taux de protection 50 p. 100 du vaccin pur est de 5 000.

On observe une diminution de l'action du vaccin avec les dilutions décimales, mais ces variations ne sont pas proportionnelles au nombre de germes utilisés pour la vaccination.

TABLEAU I. — Survie des souris dans l'expérience I.

Nombre de germes virulents inoculés	Témoins	V a c c i n			
		dilué au			pur
		1/1000	1/100	1/10	
$3 \cdot 10^5$		1/9	1/10	0/9	4/10
$3 \cdot 10^4$		0/10	1/10	1/10	6/10
$3 \cdot 10^3$	0/5	1/10	2/10	2/10	7/10
$3 \cdot 10^2$	0/5	0/10	4/10	7/10	
$3 \cdot 10$	0/5
3	4/5
0,3	4/5
?	5/5
DL 50 =	$10^{-4,75}$?	$10^{-2,79}$	$10^{-2,51}$	$10^{-1,054}$
Taux de Protection 50 =		?	90	170	5.000

Si nous présentons les résultats en tenant compte du pourcentage de survie, on obtient les chiffres suivants :

1° Le vaccin pur protège 83,4 p. 100 des souris contre 100 DM₁₀₀ et contre 400 DM₅₀ ;

2° Dilué au 1/10 il protège encore 77 p. 100 des souris contre 10 DM₁₀₀ ou contre 40 DM₅₀ ;

3° La dilution au 1/100 protège 57 p. 100 des souris contre 10 DM₁₀₀ ou contre 40 DM₅₀ ;

4° Celle au 1/1 000 ne protège plus que 16,7 p. 100 des souris contre 10 DM₁₀₀ ou contre 40 DM₅₀.

Ce mode de présentation des résultats, qui ne tient compte que de la survie ou de la mortalité des souris pendant la durée de l'observation, néglige le facteur de la durée de l'évolution de l'affection chez les souris vaccinées. Or, l'allongement de la durée de la maladie traduit probablement un certain degré d'immunité. A titre d'exemple, nous observons que les 10 souris témoins ayant reçu de 300 à 3 000 germes virulents ont eu une survie moyenne de 2,8 jours, tandis que les 15 souris vaccinées avec du vaccin pur ayant reçu de 3 000 à 300 000 germes, et qui sont mortes pendant la période d'observation, ont eu une survie moyenne de 4,8 jours.

EXPÉRIENCE II. — Dans cette expérience, la souche E. V a été cultivée pendant quarante-huit heurs à 37° sur gélose Martin. La suspension en eau physiologique contenait 30 millions de germes cultivables par millilitre.

TABLEAU II. — Survie des souris dans l'expérience II.

Nombre de germes virulents inoculés	Témoins	V a c c i n			
		pur chauffé	dilué au		pur
			1/100	1/10	
8. 10 ⁵	0/7		1/6		2/7
8. 10 ⁴	0/7		2/6	2/6	5/7
8. 10 ³	0/7	0/7	0/6	6/7	7/7
8. 10 ²	0/8	0/7	1/7	5/7	6/8
8. 10 ¹	0/8	1/8	0/7	2/7	6/7
8	3/8	5/8	6/7		.
0,8	4/5		.	.	.
7	5/5		.	.	.
DL 50 =	10 ^{-5,30}	10 ^{-4,64}	10 ^{-4,29}	10 ^{-3,18}	10 ^{-0,82}
Taux de Protection 50 =		4,6	10	130	30.000

Le tableau II donne les résultats détaillés. Le taux de protection 50 p. 100 du vaccin pur est ici de 30 000. On observe encore une décroissance rapide, mais non proportionnelle du taux de protection avec les dilutions décimales.

Dans cette expérience, à titre de témoin complémentaire, nous avons préparé un lot de souris avec le vaccin pur tué par chauffage de cinq minutes à 100°. Nous en avons contrôlé la stérilité. Dans ce cas le

laux de protection est pratiquement nul : 4,6. Mais ceci ne peut être utilisé comme un argument pour démontrer l'inefficacité du vaccin chauffé, car aucune des précautions recommandées pour conserver les antigènes vaccinaux n'a été observée. Il s'agit donc d'une réaction témoin de portée très limitée.

Les résultats présentés, en tenant compte du pourcentage de survies, nous donnent les chiffres suivants :

1° Avec le vaccin pur : 82,4 p. 100 des souris inoculées avec 100 DM₁₀₀ ou 2 000 DM₅₀ survivent ;

2° Avec la dilution au 1/10 : 78 p. 100 des souris inoculées avec 1 DM₁₀₀ ou 20 DM₅₀ survivent ;

3° Avec la dilution au 1/100 : 33 p. 100 des souris inoculées avec 1 DM₁₀₀ ou 20 DM₀₅ survivent ;

4° Avec le vaccin chauffé : 11 p. 100 des souris inoculées avec 1 DM₁₀₀ ou 20 DM₅₀ survivent.

La durée de l'évolution nous montre que pour 29 témoins ayant reçu de 800 à 800 000 germes, la durée de l'évolution est de 2,2 jours, tandis que pour 9 souris vaccinées avec du vaccin pur ayant reçu la même quantité de germes et mortes pendant l'observation, le temps de l'évolution est de 3,9 jours.

DISCUSSION. — Le contrôle de l'activité vaccinnante de la souche E. V. de Girard et Robic était jusqu'ici uniquement pratiqué sur cobaye. Les tests d'efficacité mis au point par Girard sont de deux ordres :

1° *D'une part*, la vérification de la réaction splénique du cobaye après inoculation intrapéritonéale du vaccin (1 milliard de germes) en sacrifiant l'animal au sixième jour.

La réaction splénique du cobaye se traduit par la présence de réactions nodulaires bien étudiées par Bablet, Girard et Robic [4].

Ces nodules existeraient toujours, même lorsque microscopiquement on n'observe pas de granulations.

Robic [5] attache une très grande valeur à ce test pour la détermination de la valeur immunisante de la souche E. V.

2° *D'autre part*, l'inoculation après des temps variables de suspension de bacilles pesteux virulents à des cobayes vaccinés.

On utilise comme voie d'inoculation la peau rasée et excoriée du flanc de l'animal sur laquelle on dépose en frictionnant une suspension de fragments de rate de cobaye mort de peste et dont la richesse en germes a été contrôlée.

Méthode extrêmement sévère [6], à laquelle on peut reprocher toutefois de ne pas permettre la détermination précise du nombre de doses mortelles auxquelles sont ainsi exposés les animaux vaccinés [7].

Un essai de titrage a cependant montré que les cobayes éprouvés par cette méthode étaient infectés par un nombre considérable de DM₁₀₀.

En 1946, Favarel [8] utilisa comme technique d'épreuve l'inoculation intrapéritonéale au cobaye de 2 à 3 000 bacilles pesteux virulents.

Il n'est donc pas possible d'admettre le point de vue de Taylor [9], qui estime que le cobaye est un animal impropre aux recherches sur la vaccination, à la fois par sa résistance aux toxines et par sa réaction médiocre à l'immunisation. Il est vrai que cet auteur parle de vaccination antipesteuse par germes tués.

En ce qui concerne la souris, tous les auteurs, à la suite de Sokhey, s'accordent maintenant pour estimer qu'elle est au moins aussi intéressante que le cobaye pour l'étude d'un vaccin antipesteux. Meyer et ses collaborateurs [10] ont insisté sur la haute valeur de la souris blanche pour l'expérimentation du vaccin antipesteux. Ces auteurs arrivèrent à la conclusion que l'antigène I. B., essentiel pour la protection de l'homme, était également indispensable à la protection de la souris. Ils ajoutaient que, pour cette raison, il était souhaitable d'utiliser des souris plutôt que des cobayes pour mesurer le pouvoir immunisant d'un vaccin antipesteux.

Il est bien évident qu'une condition préliminaire doit être remplie : l'utilisation d'une souche de souris dont la sensibilité au bacille pesteux ainsi que leur aptitude à s'immuniser ont été contrôlées.

CONCLUSIONS. — Nous envisageons d'utiliser cette technique d'une part pour assurer le contrôle régulier des cultures destinées à la préparation des suspensions vaccinales et d'autre part pour comparer entre elles les différentes techniques d'immunisation, sachant cependant qu'il ne convient d'extrapoler qu'avec la plus grande prudence de la souris à l'homme.

RÉSUMÉ. — Un test de contrôle sur souris de l'activité vaccinale de la souche E. V. de Girard et Robic a été mis au point. Les résultats sont interprétés selon la méthode de Reed et Muench. Cette technique doit permettre d'assurer un contrôle efficace des cultures destinées à la production de vaccin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOKHEY (S. S.). *Indian J. med. Res.*, 1939, **27**, 313, 331, 341, 355 et 363.
- [2] PETRIE (G. F.), cité par POLLITZER (R.). *La peste*. Version française. Monographie OMS, 1954.
- [3] REED (L. J.) et MUENCH (H.). *J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [4] BABLET (J.), GIRARD (G.) et ROBIC (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 1055.
- [5] ROBIC. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1940, 13 et 38.
- [6] GIRARD (G.). *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1932, 23.
- [7] GIRARD (G.). *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1939, 17.
- [8] FAVAREL. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1946, 10.
- [9] TAYLOR (J.). *Indian med. Res. Mem.*, 1933, n° 27.
- [10] MEYER (K. F.), FOSTER (L. E.), BAKER (E. E.), SOMMER (H.) et LARSON (A.). *Proc. IV int. Cong. trop. Med. Malaria*, 1948, **1**, 264.

A PROPOS DES « FORMATIONS L »

(Note transmise par M. le professeur HAUDUROY,
Institut d'Hygiène, Lausanne)

Les membres de la réunion sur les formes L et sur les formes évolutives des bactéries, tenue à Lausanne les 17 et 18 mai 1956, sont d'accord sur les remarques suivantes :

I. — De nombreux cycles de bactéries diverses ont été décrits sous des noms différents : formes L, formes filtrantes invisibles, formes évolutives, etc. Assez souvent, toutes ces formes bactériennes sont désignées sous le nom de « cycle L ». Il semble préférable, en l'état actuel de nos connaissances, de maintenir des appellations différentes pour décrire des phénomènes et des aspects qui ne sont peut-être pas les mêmes.

II. — E. Klieneberger-Nobel a utilisé dans tous ses travaux, rédigés en langue anglaise, l'expression « L forms » pour désigner les aspects nouveaux de certaines colonies bactériennes apparaissant *in vitro*, spontanément ou par induction.

Or, le mot anglais « form » a été, semble-t-il, mal interprété par nombre de microbiologistes de langue latine. Ceux-ci lui ont donné, en effet, le sens de « morphologie individuelle des éléments bactériens ». Cette interprétation défectueuse se manifeste, à l'heure actuelle, couramment dans le langage parlé ou écrit par les expressions suivantes : « formes L naines », « formes L globuleuses », etc. (E. Klieneberger-Nobel elle-même a parfois fait une erreur semblable en utilisant l'expression « L-element »). E. Klieneberger-Nobel rejette complètement cette traduction du mot anglais « form » et désire qu'il soit traduit en français par le mot « formation », en allemand par « Phase ». Elle estime, en effet, que l'on doit désigner comme « formation L » (L = Lister), « L form », « L Phase » la formation qui peut se produire spontanément ou par induction et qui est caractérisée par une colonie qui montre sur milieu dépourvu de substance inductives (par exemple pénicilline) une morphologie fixe (centre plus dense que la périphérie). Les microorganismes contenus dans ces formations ne doivent pas répéter la morphologie des bactéries qui sont à l'origine de ces formations elles-mêmes.

III. — Aussi longtemps que le mécanisme de développement et la structure des éléments des formations L ne sont pas entièrement élucidés, il faut éviter de désigner toutes les bactéries pléomorphes, les « corps globuleux, les granulations et les formes filtrantes, etc. » sous le terme de « forme L ».

Ces formes doivent garder leur désignation propre (bactérie pléomorphe, corps globuleux, formes filtrantes, etc.) pour éviter toutes confusions.

IV. — Hauduroy a désigné, en 1924, sous le terme de « formes filtrantes et invisibles des bactéries », des éléments obtenus expérimentalement grâce au bactériophage et découverts dans la nature et dans certains produits pathologiques. Ces éléments redonnent, grâce à des repiquages selon une technique précise, les bactéries dont ils sont issus. Ils ne sont donc pas des formes fixées, mais prennent probablement place dans un cycle évolutif.

V. — Enfin, des analogies et aussi des différences existent encore à l'heure actuelle entre les « PPLO » (pleuropneumonia-like organisms) et les formations L telles qu'elles ont été décrites précédemment et il n'y a pas lieu, pour l'instant, de confondre en quoi que ce soit ces deux types d'organismes. Les termes qui risqueraient de créer une confusion doivent être évités.

(Les membres de la réunion : D^r Bassermann, professeur Carrère, professeur Fasquelle, professeur Hauduroy, M^{me} Klieneberger-Nobel, professeur Penso, professeur Roux, D^r Tunçman.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude de l'aptitude d'*Anopheles maculipennis atroparvus* à inoculer au lapin les souches atténuées de virus du myxome infectieux, par H. JACOTOT, C. TOUMANOFF, A. VALLÉE et B. VIRAT.

Propriétés du sérum des chevaux soumis à des immunisations successives et à des saignées régulières. Persistance de l'effet produit par les premiers antigènes, par M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et M. GEOFFROY.

Rapports entre l'activité catalasique, la résistance à l'isoniazide et le pouvoir pathogène des souches isoniazido-résistantes, par B. KREIS et E. LE JOUBIUX.

Sur une modalité particulière d'action de la spiramycine *in vitro*, par D. VIDEAU et H. JONCHÈRE.

Etude des formes L des bactéries apparues spontanément *in vivo*. II. Caractères particuliers des éléments granulaires, par J. VIGOUROUX et C. HANNOUN.

Etude des formes L des bactéries apparues spontanément *in vivo*. III. Histopathologie comparée des lésions provoquées par la bactérie normale et ses formes modifiées, par C. HANNOUN, J. VIGOUROUX, J. LEVADITI et O. NAZIMOFF.

AVIS

La Direction de l'Institut Pasteur a décidé d'appliquer dorénavant la règle qu'aucun manuscrit présenté pour publication dans les *Annales de l'Institut Pasteur* ne doit dépasser 20 pages dactylographiées à 2 interlignes, sur papier de format standard (21 × 27) avec une marge d'au moins 4 cm.

Il ne sera fait aucune exception à cette règle.

Les auteurs dont les travaux nécessiteraient pour les exposer un nombre de pages supérieur sont priés de bien vouloir diviser leur texte en deux ou trois parties, étant bien entendu qu'un numéro des *Annales* ne doit pas comporter plus d'un article du même auteur ; les articles ainsi divisés paraîtront, par conséquent, dans des numéros successifs.

La Direction prie instamment les auteurs de bien vouloir réduire au strict nécessaire le nombre de tableaux, de figures et de planches accompagnant leur manuscrit.

LIVRES REÇUS

Ciba Foundation. Colloquia on Endocrinology. Vol. 9. Internal secretions of the pancreas. 1 vol., 292 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1956, Prix : 40 shillings.

A la suite du colloque tenu en 1952 sur « les facteurs hormonaux du métabolisme des glucides », il avait été décidé que le prochain Symposium serait consacré à « la nature et aux actions des sécrétions internes du pancréas ». Les communications réunies dans le présent volume étudient, en effet, les différents progrès qui ont été réalisés dans ce domaine au cours de ces dernières années : les cellules α du pancréas, productrices de glucagon, et les résultats morphologiques et métaboliques de leur destruction expérimentale ; l'action de l'hormone hypophysaire de croissance sur la sécrétion de l'insuline ; la structure chimique de l'insuline ; l'action de l'insuline sur le foie ; les propriétés chimiques et biologiques du glucagon, etc. Au fur et à mesure que les connaissances progressent, la complexité de la question apparaît de plus en plus et, en particulier, les réactions des diverses hormones les unes sur les autres rendent parfois difficile l'interprétation des faits observés.

H. T.

Tuberculosis control. Plans for intensified inter-country action in Europe. Report of a study group. World Health Organization : Technical Report Series, 1956, n° 112 ; 14 pages. Prix : 1 s. 9 d., \$ 0,30, ou Fr. suisses : 1,-.

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 91

Notices nécrologiques.

† Maurice JAVILLIER (1875-1955)	260
† Emile CESARI (1876-1956)	928

AITOFF (M.). — Quelques remarques sur le « cord factor » des souches avirulentes du b. tuberculeux	393
ALIX (D.). — Voir DESBORDES (J.).	
ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — L'activité peroxydasique des Mycobactéries	586
— TACQUET (A.) et GERNEZ-RIEUX (Ch.). — Activité catalasique des Mycobactéries	767
ATANASIU (P.). — Voir LÉPINE (P.).	
AUBERT (J.-P.). — Voir MILHAUD (G.).	
AUGIER (J.). — Recherches sur la mesure de l'activité hémicellulolytique des sols. III	369
— A propos de la numération des <i>Azotobacter</i> en milieu liquide	759
BALÉA (T.). — Voir COPLEY (A. L.).	
BARBU (E.). — Voir KI YONG LEE.	
BARSKI (G.). — Modèle perfectionné d'un appareil à trypsination des tissus pour cultures cellulaires	103
— Caractère spécifique de la lésion cellulaire causée <i>in vitro</i> par les virus du groupe APC et sa valeur diagnostique.	614
— et CORNEFERT (Fr.). — Interférence de la ribonucléase avec la multiplication du virus poliomyélitique en cultures cellulaires <i>in vitro</i>	810
— Voir LÉPINE (P.).	
— Voir ROBINEAUX (R.).	
BAZIN (S.), DELAUNAY (A.) et HÉNON (M.). — Etudes sur le collagène (nouvelle série). VI. De l'action exercée par des endotoxines et des polysides bactériens sur des solutions de collagène A	50
— — — La synthèse du glycogène <i>in vitro</i> par des polynucléaires sanguins	238
— Voir DELAUNAY (A.).	

- BEERENS (H.), GUILLAUME (J.) et PONTE (Cl.). — Production d'ammoniaque et toxicité de *Clostridium histolyticum* cultivé en milieu gélatiné 407
 — Voir GUILLAUME (J.).
- BENITO TRUJILLO. — Méthode sûre, rapide et simple de coloration des spores bactériennes 421
- BENTEGEAT (J.). — Voir MOUSTARDIER.
- BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1955 653
- BÉRANGER (G.). — Voir DELPY (L.-P.).
- BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M. P.) et DIRKX. — Effet inhibiteur des concentrations élevées de certains cations sur la fixation d'un bactériophage 397
- BEUMER-JOCHMANS (M. P.). — Voir BEUMER.
- BIZZINI (B.). — Voir RAYNAUD (M.).
- BOQUET (P.), IZARD (Y.), GRAVE (F.) et DEMPUECH (M.). — Influence de l'acide ascorbique et de la cortisone sur les réactions homéostatiques des petits rongeurs intoxiqués par l'antigène typhique O 292
- BOUÉ (A.) et BOUÉ (J.). — Etudes sur la répartition des groupes sanguins en Iran. II 898
- BOUÉ (J.). — Voir BOUÉ (A.).
- BOURGAÏN (M.). — Voir DUBREUIL (J.).
- BOYER (F.). — Voir CHEDID (L.).
- BRECHBUHLER (T.). — Voir GRASSET (E.).
- BRYGOO (E. R.) et COURDURIER (J.). — Test sur souris de l'efficacité du vaccin E. V. 939
 — et DODIN (A.). — Action de la hyaluronidase sur l'évolution de la rage à virus des rues chez l'homme 937
- BUFFE (D.). — Voir ROBINEAUX.
- BURDIN (J.-C.). — Voir LAVERGNE (E. DE).
- BUTTIAUX (R.), NICOLLE (P.), LE MINOR (L. et S.) et GAUDIER (B.). — Etudes sur les *E. coli* de gastro-entérite infantile 799
- BUTTIN (G.). — Voir RICKENBERG (H. V.).
- CADORE (F. DE). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- CARRÈRE (L.) et SUIRE (A.). — Identification, fréquence et antibiogramme des bacilles à Gram-négatif isolés dans les voies urinaires 187
- CASTELLANI (A.). — Sur une variété de *Cloaca cloacae* (Jordan) *Aerobacter cloacae* Bergey et alia, trouvée dans les bulles intactes d'une maladie pemphigoïde à évolution chronique : *Cloaca cloacae* var. *marocana* n. n. Quelques considérations sur le genre *Cloaca* Cast. et Chalm. 581
- CECCALDI (J.). — Voir DEPOUX (R.).
- CHABBERT (Y.) et DEBRUGE (J.). — La résistance naturelle des staphylocoques au chloramphénicol 225

- CHALLUT (F.). — Voir SOHIER (R.).
- CHALVIGNAC (M.-A.). — A propos de la numération de la flore totale tellurique. Technique en milieu liquide 602
- CHAMBON (L.) et FOURNIER (J.). — Constitution antigénique de *Malleomyces pseudo-mallei*. I et II 355 et 472
- CHANY (Ch.). — Voir LÉPINE (P.).
- CHARCONNET-HARDING (F.) et HIRSCH (A.). — Effet de la carence totale en vitamine B6 sur la multiplication du B. K. . . 120
- CHARDONNET (Y.). — Voir SOHIER (R.).
- CHEDID (L.) et BOYER (F.). — Disparition de l'action anti-endotoxique de la cortisone au cours de la vaccination anti-coquelucheuse 380
- CHEVALIER (A.). — Voir GIRARD (G.).
- CHRYSSOSTOMIDOU (O.). — Voir COPLEY (A. L.).
- COHEN (N.). — Voir RICKENBERG (H. V.).
- COHEN (N.) et RICKENBERG (H. V.). — Concentration spécifique réversible des aminoacides chez *E. coli* 693
- COLAS (A.). — Voir FINE (J. M.).
- COMANDON (A.). — Voir MANIGAULT (P.).
- COMBES (R.), STAUB (A. M.) et LE MINOR (L.). — Dosage de l'antigène O au cours de la conservation de quelques souches de *S. typhi* en divers milieux 75
- COPLEY (A. L.), BALEA (T.) et CHRYSSOSTOMIDOU (O.). — Thrombocytopénie, hyperagglutinabilité et adhésivité plaquettaires provoquées par le BCG chez le lapin 736
- CORNEFERT (F.). — Voir BARSKI (G.).
— Voir LÉPINE (P.).
- COSTIL (L.). — Voir DROUHET (V.).
- COURDURIER (J.). — Voir BRYGOO (E. R.).
- DARRASSE (H.). — Voir LE MINOR (L.).
- DAVARPANAH (C.) et STAUB (A. M.). — Etude immuno-chimique sur les salmonelles. III. — Hémagglutinines et précipitines de quelques sérums anti-*S. gallinarum* et anti-*S. typhi* . . 564
— Voir STAUB (A. M.).
- DELAPORTE (B.). — La « restauration par voisinage » chez des bactéries irradiées par des rayons X 727
- DELAUNAY (A.), PELLETIER (M.), HÉNON (M.) et BAZIN (S.). — Etude des agglutinines amidon et levure chez le lapin. Leur parenté avec les agglutinines typhiques 269
— — — et TOULLET (F.). — Etude des agglutinines amidon et levure dans les sérums humains 274
— Voir BAZIN (S.).
- DELPUECH (M.). — Voir BOQUET (P.).
- DELPY (L. P.), BÉRANGER (G.) et KAWEH (M.). — Méthode de numération de bactéries vivantes 112

- DEPOUX (R.), MERVEILLE (P.) et CECCALDI (J.). — Etude de la réaction de fixation du complément dans la trypanosomiase humaine 684
- DESBORDES (J.) et FOURNIER (E.). — Action des substances colorantes sur les Mycobactéries. VII. Colorants de la série des phtalocyanines. Leur intérêt pour la différenciation des germes virulents et du BCG 584
- ROSENBERG (E.) et ALIX (D.). — Contribution à l'étude de la physiologie bactérienne. Virulence et équipement enzymatique des Mycobactéries 12
- DEVISME (M.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- DIRKX (J.). — Voir BEUMER (J.).
- DODIN (A.). — Voir BRYGOO (E. R.).
- DOMERCQ (S.). — Voir PEYNAUD (E.).
- DRÉAN (D.). — Voir LE MINOR (L.).
- DROUHET (V.) et COSTIL (L.). — Utilisation des cultures de tissu rénal du singe africain *Erythrocebus patas* pour les recherches sur la poliomyélite 818
- DUBREUIL (J.), VASSALO (B.) et BOURGAIN (M.). — Technique nouvelle d'homogénéisation rapide pour la recherche du B. K. dans les crachats et produits de tubages gastriques . . . 124
- DUCHON (L.). — Précisions sur le système plaquettes-hémoconies et aperçu du rôle des productions plaquettaires dans la défense passive toxi-infectieuse 129
- EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (L.) et MAUPIN (B.). — Les antigènes hétérophiles J, R et A des plaquettes et leucocytes humains. 598
- Voir FINE (J. M.).
- Voir PODLIACHOUK (L.).
- FAUCONNIER (B.). Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné. VI. Etude de la remontée du pH du liquide infecté après acidification par le citrate d'ammonium 657
- FAURE (M.) et MORELEC-COULON (M. J.). — Méthode de préparation du cardiolipide 537
- FAVIER (G.). — Voir SOHIER (R.).
- FINE (J. M.), EYQUEM (A.) et COLAS (A.). — Valeur comparative de la réaction indirecte de Coombs et des globules rouges papainés pour la détection des agglutinines irrégulières. 771
- et THÉBAULT (J.). — Contribution à l'étude de l'antigène érythrocytaire humain A₄ 892
- FISCHER (G.). — Voir RAYNAUD (M.).
- FOURNIER (E.). — Voir DESBORDES (J.).
- FOURNIER (J.). — Voir CHAMBON (L.).
- GARTNER (H.). — Recherches sur l'action de la spiramycine *in vitro*. 312
- GAUDIER (B.). — Voir BUTTIAUX (R.).
- GAUTHERIE (J.). — Voir HINGLAIS (H.).

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS 951

GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Action de la cyclosérine sur la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin . . .	623
— Voir ANDREJEW (A.).	
GERARD (G.) et CHEVALIER (A.). — Comportement de <i>P. pestis</i> à l'égard du rhamnose (A propos de la communication de Brygoo et Courdurier)	263
— Voir TOUCAS (M.).	
GIUNTINI (J.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
GLEYE (H.) et SANDOR (G.). — Etude des effets humoraux de l'adrénaline	249
GORET (P.), JOUBERT (L.) et OUDAR (J.). — Invalidité de la distinction entre <i>S. gallinarum</i> et <i>S. pullorum</i> et de leurs variantes biochimiques entre elles	31
GRABAR (J.) et LE MINOR (S.). — Epreuve de virulence de <i>S. paratyphi</i> A sur embryon de poulet ; son application à la séro-protection de sujets immunisés par le vaccin anti-typho-paratyphoïdique	117
GRASSET (E.), PONGRATZ (E.) et BRECHBUHLER (T.). — Analyse immunochimique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélifié . . .	162
GRAVE (F.). — Voir BOQUET (P.).	
GUILLAUME (J.), BEERENS (H.) et OSTEUX (H.). — Production de gaz carbonique et fermentation du glyecocolle par <i>Clostridium histolyticum</i>	721
GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et DEVISME (E.). — Immunisation avec l'anatoxine <i>œdematiens</i>	459
HAMON (Y.). — Contribution à l'étude des pyocines	82
HANNOUN (C.) et VIGOUROUX (J.). — Application de l'hémoculture en embryon de poulet (hémovoculture) à la septicémie expérimentale du lapin	670
— Voir VIGOUROUX (J.).	
HAUDUROY (P.). — A propos des formations L	944
HELLEU (C.). — Contribution à l'étude des propriétés anti-bactériennes de la gelée royale	231
HÉNON (M.). — Voir BAZIN (S.).	
— Voir DELAUNAY (A.).	
HINGLAIS (H. et M.) et GAUTHERIE (J.). — Etude du pouvoir bactéricide et antibiotique de la gelée royale	127
HINGLAIS (M.). — Voir HINGLAIS (H.).	
HIRSCH (A.). — Voir CHARCONNET-HARDING (F.).	
HIRTH (L.) et SEGRETAIN (G.). — Quelques aspects de la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en culture de tissus	523
HUET (M.). — Voir LE MINOR (L.).	
IONESCO (H.). — Mutant d'un bactériophage tempéré chez <i>Bacillus megaterium</i>	713

- IZARD (Y.). — Voir BOQUET (P.).
- JACOB (F.) et WOLLMAN (E.). — Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *E. coli*. I. L'induction par conjugaison ou induction zygotique 486
- JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Sur l'inoculation de *Vibrio fœtus* à la femelle gestante de cobaye 591
- JAGGER (J.) et LATARJET (R.). — Spectres d'action de la photo-restauration chez *E. coli* B/r 858
- JOUBERT (L.). — Voir GORET (P.).
— Voir PRÉVOT (A.-R.).
- KAWEH (M.). — Voir DELPY (L. P.).
- KI YONG LEE, WAHL (R.) et BARBU (E.). — Contenu en bases puriques et pyrimidiques des acides désoxyribonucléiques des bactéries 212
- KONISHI (Y.). — Voir NAGANO (Y.).
- KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER (M.) et SENEZ (J.). — Dégradation bactérienne des hydrocarbures paraffiniques. I. Isolement et caractérisation de souches marines et terrestres appartenant au genre *Pseudomonas* 60
- KOURILSKY (R.). — Voir ROBINEAUX (R.).
- KRÉGUER (A.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- KREIS (B.), LE JOUBIOUX (E.) et PARIENTE (D.). — Hétérogénéité des taux catalasiques dans les populations de bacilles tuberculeux INH résistantes 932
- LAFON (M.). — Sur quelques caractères physiologiques et biochimiques des levures de vin 91
- LAJUDIE (J.). — Etude de la microflore thermophile tellurique. I. Les techniques 778
- LATARJET (R.). — Voir JAGGER (J.).
- LAVERGNE (E. DE), BURDIN (J. C.), SCHMITT (J.) et LE MOYNE (M. T.).
Etude du comportement de 17 espèces anaérobies strictes vis-à-vis de 11 antibiotiques 631
- LEGOCQ (E.). — Voir LINZ (R.).
- LE JOUBIOUX (E.). — Voir KREIS (B.).
- LE MINOR (L.). — Etude sur les *Salmonella* du groupe D possédant les antigènes flagellaires a-1,5 664
— DARRASSE (H.) et NAZAUD (R.). — Un nouveau sérotype de *Salmonella* : *S. kaolack* (47 : z-1,6) 400
— HUET (M.) et DRÉAN (D.). — Un nouveau sérotype de *Salmonella* : *S. tunis* (1, 13, 23 : y : z₆) 936
- LE MINOR (L. et S.) et DARRASSE (H.). — Un nouveau sérotype de *Salmonella* : *S. thiaroye* (38 : eh, 1, 2) 935
- LE MINOR (L.). — Voir BUTTIAUX (R.).
— Voir COMBES (R.).
— Voir TOUCAS (M.).

- LE MINOR (S.). — Voir BUTTIAUX (R.).
 — Voir GRABAR (J.).
 — Voir LE MINOR (L.).
- LE MOYNE (M. T.). — Voir LAVERGNE (E. DE).
- LE NOC (P.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- LÉPINE (P.) et ATANASIU (P.). — Sur la valeur antigénique et vaccinnante du virus de Newcastle inactivé par la β -propionolactone 100
- BARSKI (G.) et CORNEFERT (F.). — Résultats comparatifs des séro-neutralisations et des titrages du virus poliomyélitique exécutés par micro-méthode sur plaques en matière plastique et par la méthode classique sur tubes 427
- CHANY (Ch.) et ROBBE-FOSSAT (F.). — Etude des virus APC (adéno-virus). Isolement en France de virus du type APC (souches P₃₂ et P₄₄) 607
- LINZ (R.) et LECOCQ (E.). — Sur l'action bactéricide de la pénicilline, de la streptomycine et d'un mélange synergique de pénicilline et de streptomycine 542
- LOISELEUR (J.). — Sur le mode d'action du sérum antiréticulaire (sérum de Bogomoletz) 445
- LUTZ (A.), GROOTTEN (O.), VELU (H.) et VELU (M.). — Rôle pathogène et fréquence des bactéries du type *Bact. anitratum*. 413
- MANDIN (J.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- MANIGAULT (P.), COMANDON (A.) et SLIZEWICZ (P.). — Préparation d'un « principe inducteur » de la tumeur du *Pelargonium*. 114
- MARCELOU (U.). — Voir PAVLATOU (M.).
- MARCOVICH (H.). — Etude de l'action des rayons ultra-violet sur le système lysogène *E. coli* K12(λ), K12S, λ 511
- MARIAT (F.) et SEGRETAIN (G.). — Etude mycologique d'une histoplasmosse spontanée du singe africain (*Cynocephalus babuin*) 874
- et VIEU (M.). — Action fongistatique du propionate de sodium et du lauryl sulfate de sodium ; leur synergie en association 678
- MAUPIN (B.). — Voir EYQUEM (A.).
- MAZUREK (C.). — Voir TARDIEUX (P.).
- MERVEILLE (P.). — Voir DEPOUX (R.).
- MEYER (P.). — Voir WAHL (R.).
- MILHAUD (G.), AUBERT (J.-P.) et NIEL (C. B. van). — Etude de la glycolyse de *Zymosarcina ventriculi* 363
- MONOD (J.). — Voir RICKENBERG (H. V.).
- MORELEC-COULON (M. J.). — Voir FAURE (M.).
- MOUSTARDIER (G.), BENTEGEAT (J.) et LE NOC (P.). — Etude des modifications de la flore intestinale du nourrisson et du jeune enfant sous l'influence des antibiotiques 10
- MUTAI (M.). — Voir NAGANO (Y.).

- NAGANO (Y.), ODA (M.), MUTAI (M.) et KONISHI (Y.). — Influence du sérum antiphagique sur l'adsorption du bactériophage par le bacille sensible 641
- NAZAUD (R.). — Voir LE MINOR (L.).
- NICOLLE (P.). — Voir BUTTIAUX (R.).
- NIEL (C. B. van). — Voir MILHAUD (G.).
- ODA (M.). — Voir NAGANO (Y.).
- OUDAR (J.). — Voir GORET (P.).
- PARIENTE (D.). — Voir KREIS (B.).
- PATRIGALLA (M.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- PAVLATOU (M.) et MARCELOU (U.). — Milieu favorisant la formation des chlamydo-spores de *Candida albicans* 410
- PELLETIER (M.). — Voir DELAUNAY (A.).
- PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — Sur les levures dénommées *Saccharomyces steineri* et *Saccharomyces italicus* 574
- PRÉCHAUD (D.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN.
- PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). — Les antigènes érythrocytaires et plasmatiques des porcs 751
— Voir EYQUEM (A.).
- PONGRATZ (E.). — Voir GRASSET (E.).
- PONTE (Cl.). — Voir BEERENS (H.).
- PRÉVOT (A.-R.), MANDIN (J.), GIUNTINI (J.) et THOUVENOT (H.). — Etude d'un phage actif sur les Corynébactéries anaérobies. 766
— TARDIEUX (P.), JOUBERT (L.) et CADORE (F. de). — Recherches sur *Fusiformis nucleatus* (KNOIR) et son pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux 787
— THOUVENOT (H.), PATRIGALLA (M.) et SILLIOC (R.). — Une nouvelle espèce anaérobie des lacs du Ruwenzori, *Infla-bilis lacustris* n. sp. 929
— Voir RAYNAUD (M.).
- RAYNAUD (M.), FISCHER (G.), PRÉVOT (A.-R.) et BIZZINI (B.). — Au sujet de la disparition de la lignine dans les cultures de *Pseudomonas* 267
- RICKENBERG (H. V.), COHEN (G. N.), BUTTIN (G.) et MONOD (J.). — La galactoside-perméase d'*E. coli* 329
— Voir COHEN (G. N.).
- ROBBE-FOSSAT (F.). — Voir LÉPINE (P.).
- ROBINEAUX (R.) et BARSKI (G.). — Platine thermostatique à perfusion d'eau pour l'observation prolongée de cellules vivantes 106
— BUFFE (D.) et KOURILSKY (R.). — Recherches sur la formation de la cellule de Hargraves 109
- ROSENBERG (E.). — Voir DESBORDES (J.).
- SANDOR (G.). — Voir GLEYE (H.).
- SARNOWIEC (W.). — Détermination de la vitalité d'un vaccin BCG par la réduction du bleu de méthylène 780

- SCHAEFFER (P.). — Transformation interspécifique chez des bactéries du genre *Hemophilus* 192
- Analyse génétique de la résistance à la streptomycine chez le pneumocoque 323
- SCHMITT (J.). — Voir LAVERGNE (E. DE).
- SECRETAIN (G.). — Voir HIRTH (L.).
- Voir MARIAT (F.).
- SENEZ (J. C.). — Voir KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER (M.).
- SILLIOT (R.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- SLIZEWICZ (P.). — Voir MANIGAULT (P.).
- SOHIER (R.), CHALLUT (F.) et CHARDONNET (Y.). — Le phénomène de « rappel » par injection de salive ou de L. C.-R. de sujets atteints d'oreillons à des cobayes immunisés contre cette infection (essai de mise au point d'une méthode de diagnostic rapide de l'infection ourlienne chez l'homme, 2^e note) 436
- FAVIER (G.), CHARDONNET (Y.) et CHALLUT (F.). — Etude du pouvoir hémagglutinant de neuf souches de virus des oreillons pour des hématies de différentes espèces . . . 137
- STAUB (A. M.) et DAVARPANAH (C.). — Etude immuno-chimique sur les salmonelles. II 338
- Voir COMBES (R.).
- Voir DAVARPANAH (C.).
- SUIRE (A.). — Voir CARRÈRE (L.).
- SZTUM-RUBINSTEIN (S.) et PIÉCHAUD (D.). — Etude comparée de *Sh. boydii* 3 et d'un *Paracoli anaerogenes* 403
- TACQUET (A.). — Voir ANDREJEW (A.).
- Voir GERNEZ-RIEUX (Ch.).
- TARDIEUX (P.) et MAZUREK (C.). — Action de la salive dans certaines infections expérimentales 774
- Voir PRÉVOT (A.-R.).
- TEAL (E.). — Relations immunologiques entre *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* 68
- THÉBAULT (J.). — Voir FINE (J. M.).
- THOUVENOT (H.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- TOUCAS (M.), GIRARD (G.) et LE MINOR (L.). — Relations antigéniques entre les *Salmonella* du groupe D et *Pasteurella pseudotuberculosis* type IV 595
- TOULLET (F.). — Voir DELAUNAY (A.).
- VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.).
- VASSALO (B.). — Voir DUBREUIL (J.).
- VELU (M.). — Voir VELU (P.).
- VELU (P.) et VELU (M.). — La purée globulaire de mouton et ses variations de résistance à l'hémolyse appréciées par mesure turbidimétrique 417
- VIALAT (Ch.). — Voir BÉQUIGNON (R.).

- VIALLIÈRE (J.). — Détermination de la race du bacille tuberculeux de 331 souches isolées dans l'agglomération lyonnaise . . . 590
- VIEU (M.). — Voir MARIAT (F.).
- VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). — Etude des formes L des bactéries apparues spontanément *in vivo*. I. Propriétés biologiques et pouvoir pathogène 912
— Voir HANNOUN (C.).
- WAHL (R.) et MEYER (P.). — Les épreuves dites « biochimiques » pour l'identification des streptocoques. I. Méthodes . . . 1
II. Résultats 147
III. Interprétation. 279
— Voir KI YONG LEE.
- WOLLMAN (E.). — Voir JACOB (F.).

Les articles du numéro publié hors série (supplément au numéro de décembre 1956, 94) n'ont pas été compris dans cette table.

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 91

<i>Acide ascorbique</i> . Influence de l'— — sur les rongeurs infectés par l'antigène typhique O	292
<i>Acides désoxyribonucléiques</i> . Contenu en bases puriques et pyrimidiques des — — des bactéries	212
<i>Adéno-virus</i> (APC). Isolement en France de virus du type APC. — Caractère spécifique de la lésion cellulaire causée <i>in vitro</i> par les virus du groupe APC	607
<i>Adrénaline</i> . Effets humoraux de l'—	614
<i>Agglutinines</i> . Parenté des — amidon et levure avec les — typhiques	249
— Les — amidon et levure dans les sérums humains	269
<i>Aminoacides</i> . Concentration spécifique réversible des — chez <i>E. coli</i>	274
<i>Anaérobies</i> . Production d'ammoniaque et toxicité de <i>Cl. histolyticum</i> en milieu gélatiné	693
— Immunisation avec l'anatoxine <i>œdematiens</i>	407
— Production de gaz carbonique et fermentation du glycolle par <i>Cl. histolyticum</i>	459
— Pouvoir pathogène de <i>Fusiformis nucleatus</i>	721
— Nouvelle espèce — des lacs du Ruwenzori, <i>Inflabilis lacustris</i> n. sp.	787
— Voir aussi <i>Antibiotiques</i> , <i>Bactériophage</i> .	929
<i>Antibiotiques</i> . Modifications de la flore intestinale aérobie du nourrisson et du jeune enfant traités par les —	10
— Résistance naturelle des staphylocoques au chloramphénicol.	225
— Action bactéricide et synergique de la pénicilline et de la streptomycine	542
— Action de la cyclosérine sur la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin	623
— Comportement de 17 espèces anaérobies strictes vis-à-vis de 11 —	631
<i>B. tuberculeux</i> . Effet de la carence totale en vitamine B6 sur la multiplication du — —	120
— Technique nouvelle d'homogénéisation rapide pour la recherche du — —	129

— Remarques sur le « cord factor » des souches avirulentes du — —	393
— Race du — — de 331 souches lyonnaises	590
— Détermination de la vitalité d'un vaccin BCG par la réduction du bleu de méthylène	780
— Hétérogénéité des taux catalasiques des populations de — — INH-résistantes.	932
— Voir aussi <i>Antibiotiques, Plaquettes.</i>	
<i>Bactériocines.</i> Etude des pyocines	82
<i>Bactériologie générale.</i> Méthode de numération des bactéries vivantes	112
— Identification, fréquence et antibiogramme des bacilles à Gram-négatif isolés dans les affections des voies urinaires	187
<i>Bactériophage.</i> Effet inhibiteur de certains cations sur la fixation d'un —	397
— Influence du sérum antiphagique sur l'adsorption du —	641
— Mutant d'un — tempéré chez <i>B. megaterium</i>	743
— Phage actif sur les <i>Corynébactéries</i> anaérobies	766
— Voir aussi <i>Induction.</i>	
<i>Bacterium anitratum.</i> Rôle pathogène et fréquence des bactéries du type — —	413
<i>Bogomoletz.</i> Voir <i>Sérum antiréticulaire.</i>	
<i>Catalase.</i> Voir <i>Mycobactéries.</i>	
<i>Champignons.</i> Milieu favorisant la formation des chlamydo-spores de <i>Candida albicans</i>	410
— Action fongistatique du propionate de Na et du lauryl sulfate de Na	678
<i>Cloaca cloacae.</i> Etude d'une variété de — —	581
<i>Collagène.</i> Action exercée par des endotoxines et des polysides bactériens sur des solutions de — A	50
<i>Coqueluche.</i> Voir <i>Cortisone.</i>	
<i>Cortisone.</i> Influence de la — sur les rongeurs infectés par l'antigène typhique O	292
— Disparition de l'action anti-endotoxique de la — au cours de la vaccination anti-coquelucheuse	380
<i>Cultures cellulaires.</i> Appareil à trypsination des tissus pour — —	103
— Platine thermostatique à perfusion d'eau pour l'observation prolongée des cellules vivantes	106
<i>Enzymes.</i> Galactoside-perméase d' <i>E. coli</i>	829
— Voir aussi <i>Amido-acides, B. tuberculeux</i> et aux différents enzymes.	
<i>Formes L.</i> Propriétés biologiques et pouvoir pathogène	912
— A propos des — —	944
<i>Gastro-entérite.</i> Etude épidémiologique des — à <i>E. coli</i>	799
<i>Gelée royale.</i> Pouvoirs bactéricide et antibiotique de la — —	127
— Propriétés antibactériennes de la — — neutralisée	231

<i>Génétique</i> . Transformation interspécifique chez des bactéries du genre <i>Hemophilus</i>	192
— Analyse — de la résistance à la streptomycine chez le pneumocoque	323
<i>Glycogène</i> . Synthèse <i>in vitro</i> par des polynucléaires sanguins	238
<i>Glycolyse</i> . La — de <i>Zymosarcina ventriculi</i>	363
<i>Grippe</i> . Remontée du pH du liquide allantoïque infecté après acidification	657
<i>Groupe sanguins</i> . Les antigènes hétérophiles J, R et A des plaquettes et leucocytes humains	598
— — des porcs	751
— — Valeur comparative de la réaction indirecte de Coombs et des globules rouges papainés pour la détection des agglutinines irrégulières	771
— — Antigène érythrocytaire humain A_4	892
— — Répartition des — en Iran	898
<i>Hargraves</i> . Formation de la cellule de —	109
<i>Hémolyse</i> . La turbidimétrie appliquée à l'évaluation de la résistance à l'—	417
<i>Hémo-ovoculture</i> . Application à la septicémie expérimentale du lapin	670
<i>Histoplasmose</i> . Etude mycologique d'une — spontanée du singe africain (<i>Cynocephalus babuin</i>)	874
<i>Hyaluronidase</i> . Voir <i>Rage</i> .	
<i>Hydrocarbures</i> . Dégradation bactérienne d'— paraffiniques	60
<i>Induction</i> . L'— par conjugaison ou — zygotique	486
— L'— par les rayons UV	511
<i>Irradiation</i> . La « restauration par voisinage » chez des bactéries irradiées par des rayons X	727
<i>Levures</i> . Caractères physiologiques et biochimiques des — de vin.	91
— Etude de <i>Saccharomyces steineri</i> et <i>S. italicus</i>	574
<i>Lignine</i> . Au sujet de la disparition de la — dans les cultures de <i>Pseudomonas</i>	267
<i>Malleomyces pseudo-mallei</i> . Constitution antigénique	355
<i>Mosaïque du tabac</i> . Multiplication du virus de la — en cultures de tissus	523
<i>Mycobactéries</i> . Virulence et équipement enzymatique des —	22
— Intérêt des colorants de la série des phtalocyanines pour la différenciation des germes virulents et du BCG	584
— Activité peroxydasique des —	586
— Activité catalasique des —	767
<i>Newcastle</i> . Valeur antigénique et vaccinnante du virus de — inactivé par la β -propiolactone	100
<i>Oreillons</i> . Pouvoir hémagglutinant de neuf souches du virus des —	137
— Diagnostic rapide au moyen du « phénomène de rappel »	436

<i>Pasteurella</i> . Relations immunologiques entre <i>P. pestis</i> et <i>P. pseudotuberculosis</i>	68
— Comportement de <i>P. pestis</i> à l'égard du rhamnose	263
— Voir aussi <i>Salmonella</i> .	
<i>Peste</i> . Test sur souris de l'efficacité du vaccin E. V.	939
— Voir aussi <i>Pasteurella</i> .	
<i>Photo-restauration</i> . Spectres d'action de la — chez <i>E. coli</i> B/r	858
<i>Plaquettes</i> . Rôle des — dans la défense passive toxi-infectieuse	129
— Action du BCG sur les —	736
— Voir aussi <i>Groupes sanguins</i> .	
<i>Poliomyélite</i> . Résultats comparés du titrage du virus par micro-méthode sur plaques en matière plastique et par la méthode des tubes	427
— Interférence entre ribonucléase et multiplication du virus poliomyélique	810
— Utilisation des cultures de tissus du singe africain <i>Erythrocebus patas</i>	818
<i>Pyocines</i> . Voir <i>Bactériocines</i> .	
<i>Rage</i> . Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1955	653
— Action de la hyaluronidase sur l'évolution de la — des rues chez la souris	937
<i>Rayons U. V.</i> Voir <i>Induction</i> .	
<i>Recombinaison</i> . Voir <i>Induction</i> .	
<i>Salive</i> . Action de la — dans certaines infections expérimentales.	774
<i>Salmonella</i> . Invalidité de la distinction entre <i>S. gallinarum</i> et <i>S. pullorum</i>	31
— Dosage de l'antigène O au cours de la conservation de quelques souches de <i>S. typhi</i> en divers milieux	75
— Epreuve de virulence de <i>S. paratyphi</i> A sur embryon de poulet.	117
— Etude immunochimique. Analyse des précipitines	338
— Nouveau sérotype de — : <i>S. kaolack</i> (47 : z — 1,6)	400
— Hémagglutinines et précipitines des sérums anti- <i>S. gallinarum</i> et anti- <i>S. typhi</i>	564
— Relation antigénique entre les — du groupe D et <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> type IV	595
— du groupe D possédant les antigènes flagellaires a-1,5	664
— Nouveau sérotype de —, <i>S. thiaroye</i>	935
— Nouveau sérotype de —, <i>S. tunis</i>	936
<i>Sérum</i> . Mode d'action du — antiréticulaire	445
<i>Shigella</i> . Etude comparée de <i>Sh. boydii</i> 3 et d'un <i>Paracoli anaerogenes</i>	403
<i>Sol</i> . Activité hémicellulolytique des —	369
— Technique de numération de la flore totale tellurique en milieu liquide	602
— Numération des <i>Azotobacter</i> en milieu liquide	759

— Techniques d'étude de la microflore tellurique	778
<i>Spiramycine</i> . Etude de la — <i>in vitro</i>	312
<i>Spores</i> . Méthode de coloration des — bactériennes	421
<i>Streptocoques</i> . Les épreuves « biochimiques » pour l'identification des —. I	1
— II	147
— III	279
<i>Streptomycine</i> . Voir <i>Génétique</i> .	
<i>Syphilis</i> . Méthode de préparation du cardiolipide	537
<i>Trypanosomiase</i> . Réaction de fixation du complément dans la — humaine	684
<i>Tumeurs</i> . Préparation d'un principe inducteur de la — du <i>Pelargonium</i>	114
<i>Venins</i> . Analyse immunochimique des constituants des — de serpents	162
<i>Vibrio foetus</i> . Inoculation de — — à la femelle gestante du cobaye.	591
<i>Whitmore</i> (bacille de). Etude des antigènes M, K et O du — — —.	472

Les articles du numéro publié hors série (supplément au numéro de décembre 1956, 91) n'ont pas été compris dans cette table.

TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

(TOME 91)

ANDRÉ (J.). — Rapport sur l'activité du FOREAMI durant l'année 1954	136
Bacterial anatomy. Sixth Symposium of the Society for general Microbiology	605
CALVET (E.) et PRAT (H.). — Microcalorimétrie. Applications physico-chimiques et biologiques	606
Ciba Foundation Symposium on Histamine	426
Ciba Foundation. Colloquia on Endocrinology	946
Grenzflächenprobleme und Reaktionen im kolloidalen Zustand	786
KABAT (E. A.). — Blood groups. Their chemistry and immuno-chemistry	277
List of cultures of fungi (Sao Paulo)	426
MARSHALI (A. H. E.). — An outline of the cytology and pathology of the reticular tissue	786
MEYER-ROHN (J.). — Untersuchungen zur Chemotherapie der Hauttuberkulose	135
OEHME (J.). — Lues connata	135
Pulmonary circulation and respiratory function	425
RAVAUT (P.) et VIGNON (G.). — Rhumatologie clinique	424
Researches published from the wards and laboratories of the London Hospital and Medical College during 1955	426
RIPPEL-BALDES (A.). — Grundriss der Mikrobiologie	136
SCHMIDT (H.). — Fortschritte der Serologie	785
SILVA LACAZ (Carlos da). — Manual de Micologia medica	424
SISLEY (J. P.). — Index des huiles sulfonées et détergents modernes. Thérapeutiques récentes (Conférences d'actualités pratiques de la Faculté de Médecine de Paris)	424
TISON (F.) et AUDRIN (J.). — Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux. Techniques de laboratoire	425
Tuberculosis control. Monographie de l'O. M. S.	946
WINKLER (A.). — Die Bakterienzelle. Ein Ueberblick über den gegenwärtigen Stand unseres Wissens	135

Le Gérant : G. MASSON.

PRÉSENTATION

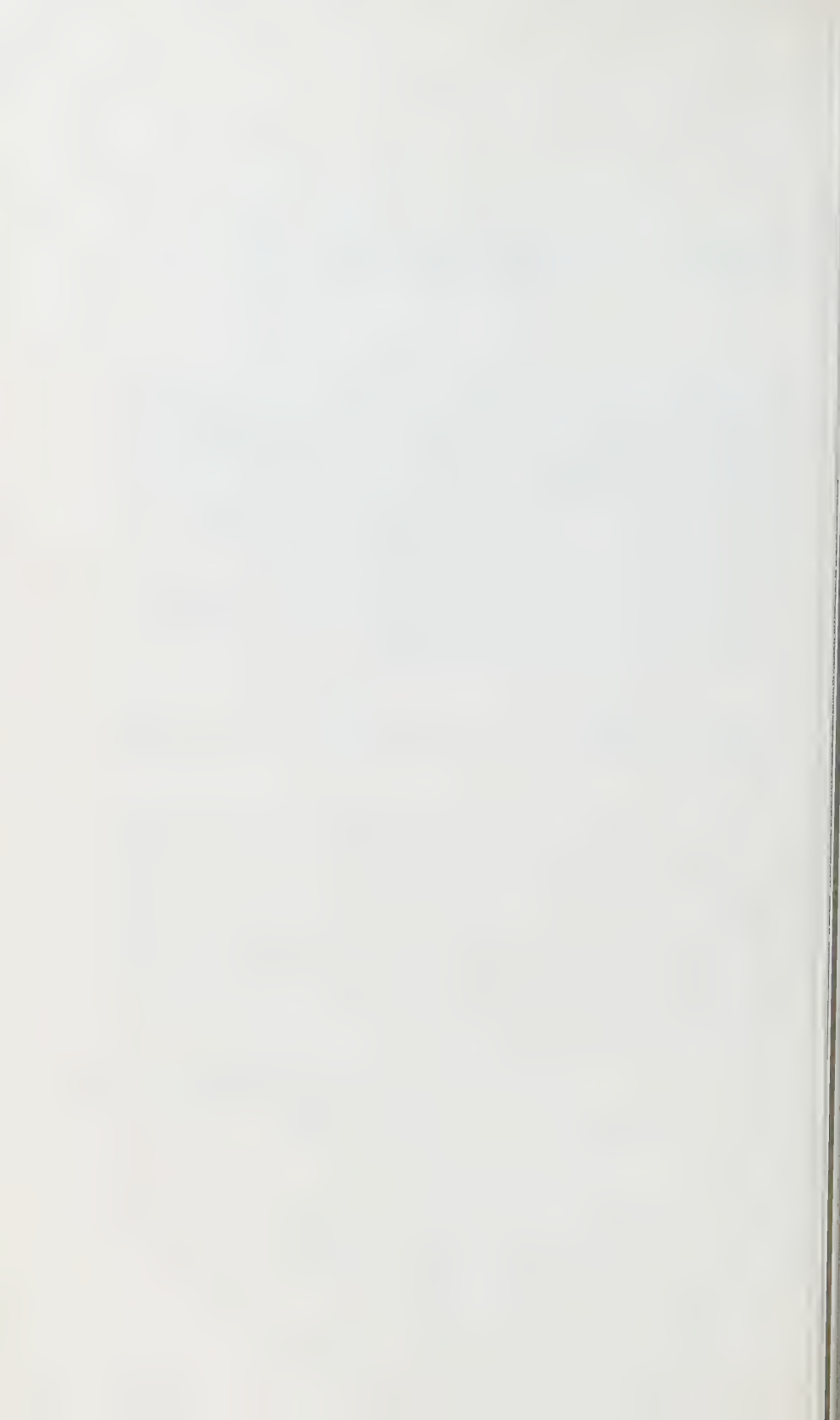
Du 27 juin au 2 juillet 1955 a eu lieu à l'Institut Pasteur un Symposium de savants polonais, qui a permis aux travailleurs scientifiques français d'entrer en contact avec leurs collègues polonais et de prendre connaissance des importants travaux effectués dans leur pays.

Les textes des notes lues aux réunions de ce Symposium ont été adressés à la Rédaction des Annales de l'Institut Pasteur pour publication.

Nous avons cru bien faire en les réunissant dans un seul numéro, paraissant comme supplément aux Annales de l'Institut Pasteur.

Nous sommes heureux de l'occasion qui nous a été ainsi donnée de présenter aux lecteurs des Annales les travaux polonais, et de leur permettre d'apprécier les résultats du remarquable effort scientifique fourni par ces savants depuis la guerre, dans des conditions que les circonstances dramatiques qu'ils ont vécues ont rendu incroyablement difficiles.

La Rédaction.



ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

L'ENCÉPHALITE A TIQUES EN POLOGNE

par F. PRZESMYCKI, Z. TAYTSCH, Z. WROBLEWSKA, R. SEMKOW,
R. STANCZYK, Z. KAMIENIECKA, I. KIRKOWSKA, et H. KICINSKA.

Ces dernières années, une suite de publications ont paru, indiquant les foyers d'encéphalite à tiques dans le voisinage immédiat de la Pologne.

On a constaté son apparition en Blanche-Ruthénie, en Tchécoslovaquie et en Roumanie.

Nous n'avons jamais vu en Pologne d'encéphalite à tiques, du moins elle ne fut pas reconnue.

L'encéphalite à tiques a fait son apparition en 1952 dans un des districts, du moins les caractéristiques auraient pu indiquer que la maladie était de cette origine.

Pour établir l'étiologie de cette maladie, l'Institut d'Hygiène de l'Etat organisa, en avril-mai 1953, une expédition scientifique, car selon les informations reçues on aurait pu supposer l'existence d'un foyer d'encéphalite à tiques.

L'expédition se composait d'entomologistes, de virologues, d'épidémiologistes et de cliniciens.

Les travaux ont été conduits dans les directions suivantes :

1° On a analysé, à l'hôpital du district, les histoires des maladies au cours des quatre dernières années et choisi les cas qui, d'après les apparences cliniques, pourraient être considérés comme de l'encéphalite.

2° Tous ces cas furent examinés sur place par les médecins cliniciens, afin d'établir éventuellement les traces de la maladie. Puis on procéda à une enquête épidémiologique. Dans tous les

cas, une prise de sang a été faite pour établir la teneur en anticorps.

3° On a ramassé les tiques près des endroits où les cas particuliers se sont produits. On a ramassé environ 1 000 tiques en tout.

Il résulte de cette enquête qu'en toute probabilité le nombre suivant de cas ont été traités à l'hôpital en 1950-1953 (tableau I).

TABLEAU I.

Année	Encéphalite	Maladie de Heine-Medin	Remarques
1950	11	-	9 souches isolées des malades
1951	7	61	
1952	21	3	
1953	28	-	
Total	67	64	

Parmi les malades atteints d'encéphalite, on a noté 3 décès, dont 2 à l'hôpital. La maladie éclata en mars et se prolongea jusqu'en décembre. La plus grande intensité fut constatée en juin-juillet. Ce sont surtout les hommes qui ont été atteints.

Pendant que les travaux de l'expédition se poursuivaient, on commença à amener à l'hôpital des malades présentant des symptômes d'encéphalite. On leur prélevait, pour l'analyse, du liquide cérébro-spinal et du sang qu'on mélangeait avec de l'héparine. Ce matériel était employé pour les recherches virologiques.

Pour isoler le virus, on a injecté le sang mélangé d'héparine ainsi que le liquide cérébro-spinal à des souris blanches par voie cérébrale.

Si au bout de sept jours les souris restaient en bonne santé, on faisait des passages « aveugles » et on inoculait des séries de souris avec une suspension à 10 p. 100 de substance cérébrale provenant des souris de premier passage.

C'est ainsi qu'on poursuivait les recherches jusqu'au cinquième passage (1). Le tableau II en donne les résultats.

(1) Sur 10 échantillons de produits prélevés chez des malades, on a isolé neuf fois le virus de l'encéphalite. La souche « Klodobok » fut isolée des tiques.

Remarque : Le sang et le liquide céphalo-rachidien provenant des malades KW-N et KH-N ont été mélangés avant l'inoculation à la souris ; nous ne pouvons donc savoir si la souche fut isolée du sang ou du liquide cérébro-spinal.

Les tiques que nous avons examinées appartenaient à l'espèce *Ixodes ricinus*. Cinq cents tiques environ furent partagées en

TABLEAU II. — Isolement des souches.

Nombre ordinal	Nom de la souche	Isolement			Passage
		Homme		Tiques	
		Sang	Fl.C.Sp		
1	MK - N		+		I
2	Klodobok			+	III
3	RM - N	+			IV
4	LK - N	+			V
5	BK - N	+	+		III
6	KW - N				IV
7	PJ - N		+		IV
8	KH - N				V
9	JJ - N	+			II
10	KJ - N	+			II

groupes comprenant chacun 50 exemplaires ; on les a nettoyées trois fois à l'alcool 70 p. 100 et trois fois avec de l'eau physiologique stérilisée. Ensuite on les a broyé dans un mortier avec du sable, en ajoutant du sérum de lapin (5 p. 100) et en calculant 0,04 ml pour une tique.

La suspension fut centrifugée pendant dix minutes à 1 500 tours, minute ; le liquide surnageant, après adjonction d'antibiotiques, était contrôlé au point de vue stérilité, puis inoculé à des souris par voie cérébrale.

Les propriétés biologiques des souches isolées ont été examinées après trois passages sur la souris. Le LD₅₀, établi d'après la méthode de Reed et de Muench, oscillait entre 10⁻⁷ et 9⁻⁹. Nos souches ont été pathogènes pour les souris (inoculation intra-

cérébrale, intrapéritonéale et sous-cutanée) et pour les singes, tandis qu'elles n'infectaient ni les rats ni les cobayes. Comme témoin, on s'est servi de la souche étalon d'encéphalite à tiques reçue de Moscou. Les virus isolés par nous avaient les mêmes caractéristiques que la souche de Moscou.

Nous avons complété l'étude de nos souches par des inoculations au singe.

Nous nous sommes servis pour nos expériences des souches « Moscou », « Klodobok » (isolées des tiques), RM-N, LK-N, KW-N, PJ-N (isolées du liquide cérébro-spinal et du sang des malades).

Des singes *Macacus rhesus* ont été infectés au moyen d'une injection intracérébrale de virus sous forme de suspension à 10 p. 100 de cerveau de souris infectée. On a employé au total 9 singes. Après une période d'incubation de quatre jours, il s'est produit chez un des singes une élévation de la température et un affaiblissement général, accompagnés de frissons et de contractions musculaires. A partir du sixième jour s'installa un état tétanique et l'animal cessa de prendre de la nourriture. Le neuvième jour il fut sacrifié en agonie. Chez les autres singes, les symptômes ne furent pas aussi violents et à partir du huitième jour leur état s'est amélioré.

L'examen anatomo-pathologique du cerveau des souris a montré des lésions typiques d'encéphalite, localisées dans le cerveau et le cervelet. Ces lésions étaient identiques chez les souris infectées par la souche « Moscou » et par nos souches. Au microscope, la réaction mésodermique dominait dans le système nerveux central à côté de modifications insignifiantes des cellules nerveuses. Il y avait de l'infiltration périvasculaire dans les méninges, quelquefois dans la matière grise ou dans la matière blanche, et en outre de petites hémorragies.

L'atteinte des cellules nerveuses se manifestait uniquement par l'absorption augmentée des acides par le noyau et par une chromatolyse à peine amorcée.

Les recherches anatomo-pathologiques entreprises sur un singe ont montré l'existence de lésions caractéristiques d'encéphalite. Pour identifier les souches isolées on a effectué des réactions sur des souris. Nous avons immunisé des lapins avec nos souches. Nous nous sommes servis également des sérums de singes qui avaient été atteints d'encéphalite. A l'aide des sérums de ces animaux nous avons procédé à une neutralisation croisée des souches « Moscou » et « Klodobok » et à une neutralisation de toutes nos souches au moyen des sérums anti-« Moscou » et anti-« Klodobok ». Pour la neutralisation, nous avons mélangé des doses fixes de sérum avec des doses diminuantes de virus. Les

mélanges sérum-virus furent injectés dans le cerveau d'au moins 6 souris pour chaque dilution du virus. Les résultats ont été calculés d'après la méthode de Reed et de Muench en établissant l'index de neutralisation de chaque sérum.

Le tableau ci-dessous en donne les résultats.

TABLEAU III. — Propriétés antigéniques des souches.

: Nombre : : ordinal :	: Nom de la : : souche :	: Propriétés antigéniques :	
		: Réaction de neutralisation :	
		: Index du sérum : anti "Klodobok"	: Index du sérum anti : encéphalite à tiques : " Moscou "
: 1 :	: MK - N :	: 10.000 :	: 457 :
: 2 :	: Klodobok :	: 20.000 :	: 200 :
: 3 :	: RM - N :	: 25.685 :	: 1671 :
: 4 :	: L - K - N :		
: 5 :	: BK - N :	: 6.711 :	: 937,7 :
: 6 :	: K - V - N :	: 1.738 :	: 1047 :
: 7 :	: PJ - N :	: 10.000 :	: 1621 :
: 8 :	: K. H - N :	: 6.024 :	: 2398 :
: 9 :	: JJ. - N :	: 61.661 :	: 1659 :
: 10 :	: KJ - N :	: 10.000 :	: 3162,5 :
: Souche :	: Encéphalite :	: 279,1 :	: 2.691 :
: étalon :	: Moscou :		

Il résulte de ces recherches que les souches isolées des cas particuliers sur le territoire polonais forment un groupe uniforme. Elles montrent une certaine parenté avec la souche « Moscou », mais elles ne sont pas identiques.

Nous avons examiné en plus 15 sérums de convalescents ; 40 p. 100 de ces sérums ont neutralisé de 100 à 1 000 LD₅₀ du virus « Moscou » et « Klodobok ».

En 1954, nous avons continué nos recherches dans d'autres parties de la Pologne. La seconde expédition de l'Institut d'Hygiène d'Etat a procédé à ses travaux de la même manière. On a isolé

trois souches du sang et du liquide cérébro-spinal de malades ainsi que trois souches de tiques. L'identification des souches isolées a été accomplie sur les bases suivantes :

1° Propriétés biologiques : LD_{50} 10^{-6} - 10^{-8} . Activité pathogène pour la souris quel que soit le mode d'infection.

2° Recherches sérologiques : réaction de fixation du complément avec les antigènes préparés avec toutes les souches et du sérum anti-encéphalite à tiques « Moscou » et « Klodobok ».

3° Recherches anatomo-pathologiques : Ces recherches nous permettent de constater qu'il existe dans notre pays des foyers d'encéphalite à tiques.

Un de ces foyers se trouve dans le district N, dans la partie occidentale du pays, et, selon toute probabilité, est en rapport avec l'encéphalite à tiques en Tchécoslovaquie ; un autre foyer se trouve à l'Est de notre pays dans le district H.

Nos travaux à ce sujet seront poursuivis en 1956 et auront pour but d'établir les voies de dissémination et de rotation du virus dans la nature (ce qu'on appelle biogenèse).

VACCINS ANTIGRIPPAUX

par F. PRZESMYCKI, E. WIELKOWSKA, H. DOBROWOLSKA, Z. ZYCH.
A. FELTYNOWSKI, Z. PRZYBYKIEWICZ et J. ZANSKI.

On procède maintenant dans la plupart des pays du monde à des recherches sur l'efficacité des vaccins antigrippaux. L'extrême importance de ce problème du point de vue de la santé publique et de l'économie nationale nous a fait entreprendre des recherches dans ce domaine. Le vaccin a été préparé par deux procédés :

1° Concentration du virus au moyen d'adsorption et d'élution sur des globules rouges du sang ;

2° Adsorption du virus par le phosphate d'aluminium.

Les deux vaccins contenaient le virus tué au formaldéhyde. Trois groupes ont été formés pour poursuivre ces recherches : le premier chargé des recherches scientifiques, le second de la production du vaccin et le troisième de l'étude de l'épidémiologie et de l'organisation.

Des cliniciens ont été invités à participer à ce travail.

Le travail de tous les groupes a été dirigé et coordonné par une direction unique.

Le groupe des recherches scientifiques a préparé la documentation nécessaire à la préparation des vaccins sur l'échelle du laboratoire. Au cours de la production du vaccin, une collaboration étroite s'est établie entre les groupes de recherches scientifiques et de production, ce qui a permis d'établir une documentation sur la production. Le groupe d'épidémiologie et d'organisation a exécuté la vaccination et contrôlé l'incidence de la grippe parmi les personnes vaccinées et non vaccinées soumises à l'observation.

Les recherches ont montré que les deux souches A et A¹ du virus de la grippe se rencontrent en Pologne et en conséquence les souches suivantes ont été choisies pour la production du vaccin : 1° souches du virus A-P₆-8 (Londres, 1933) ; R (Varsovie, 1949) et Shklavier (Moscou, 1947), ainsi que deux souches du virus A¹-Pan (Moscou, 1952) et une souche tchèque (Bratislava, 1947).

La méthode d'évaluation du vaccin a été élaborée sur la base des expériences suivantes :

1° Détermination du titre d'hémagglutination ;

2° Epreuve d'inhibition d'hémagglutination avec l'immunsérum correspondant ;

3° Réaction de fixation du complément avec ce sérum ;

4° Etude du vaccin par microscopie électronique pour déter-

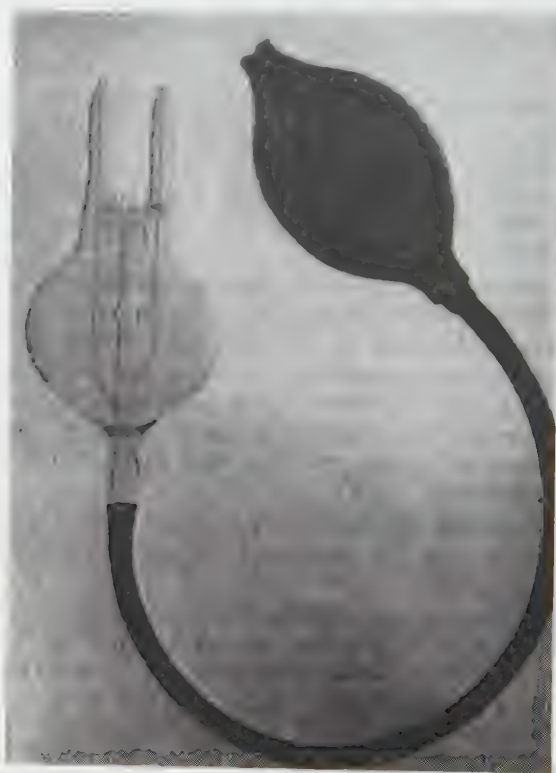


Fig. 1 et 2. — Appareil pour vaccination intranasale.

miner la présence et la concentration des corpuscules élémentaires ;

5° Epreuve d'activité du vaccin, réalisée sur des souris ;

6° Etude des qualités infectieuses du virus, contenu dans le vaccin, sur œuf de poule fécondé ;

7° Epreuve de stérilité bactérienne ;

8° Etude des qualités toxiques ;

9° Etude de la teneur en formaldéhyde.

Il a été décidé qu'à l'avenir chaque série du vaccin sera mise

à l'épreuve sur des humains. Pour contrôler le vaccin, préparé par la méthode d'adsorption par le phosphate d'aluminium, les épreuves 5 à 9 ont été employées.

La validité du vaccin a été établie provisoirement à six mois, à condition qu'il soit gardé en glacière à $+4^{\circ}\text{C}$. Le contrôle de toutes les séries de vaccin a montré que le titre d'hémagglu-

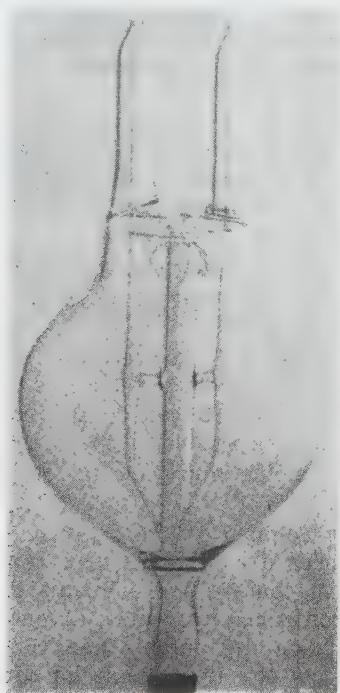


FIG. 2.

ination varie entre 1 : 1280 et 1 : 5120 et que le vaccin contient une quantité suffisante d'antigène A et A¹.

Un appareil spécial a été proposé pour la vaccination intranasale (fig. 1 et 2).

Au moyen de cet appareil, le vaccin est pulvérisé dans le nez du sujet à vacciner (quantité du vaccin de 0,5 ml) à sept à dix jours d'intervalle.

Les tâches de préparation et d'organisation de la campagne de vaccination, ainsi que l'enregistrement des cas de grippe

incombaient à un groupe de médecins et d'étudiants en médecine qui ont tous reçu une formation spéciale pour ce travail.

La campagne de vaccination eut lieu à Lodz, dans une hôtellerie pour étudiants et dans les écoles. Les examens de contrôle post-vaccinaux ont montré l'absence de réaction dans 86 p. 100 des cas. 10 p. 100 des sujets ont eu une réaction post-vaccinale légère et 2,8 p. 100 une réaction moyenne. Une forte réaction a été notée dans 0,3 p. 100 des cas seulement.

En tout, 64 610 personnes ont été vaccinées, dont 53 972 deux fois et 10 538 une seule fois. Le groupe de contrôle était composé de 3 064 sujets non vaccinés.

On a procédé ensuite à l'examen sérologique des sujets vaccinés. Des échantillons du sang ont été prélevés chez 308 personnes, deux fois avec un intervalle de sept à dix jours. Les tests comprenaient des épreuves d'inhibition de l'hémagglutination et de fixation du complément.

Les données recueillies montrent une augmentation des anticorps de 61,7 à 65 p. 100 pour le virus A et A¹ et de 25,6 à 26,7 p. 100 pour le virus B.

Le contrôle de l'efficacité de la protection assurée par le vaccin a porté sur 9 179 sujets vaccinés deux fois et sur 947 vaccinés une seule fois. Il y a eu 268 cas de grippe chez les premiers (2,9 p. 100) et 56 chez les seconds (5,9 p. 100).

Parmi les 3 064 témoins non vaccinés il y a eu 279 cas de grippe (9,1 p. 100).

Il ressort de cette enquête que la fréquence de la grippe chez les personnes vaccinées deux fois est trois fois moindre que chez les non-vaccinées. Au cours d'une épidémie de grippe on a procédé à des vaccinations dans les écoles. Là encore il y eut 2,7 fois moins de cas que parmi les enfants non vaccinés. Il en résulte que la vaccination peut être utile même au cours d'une épidémie.

Une étude détaillée de l'incidence de la grippe parmi les enfants, vaccinés au cours d'une épidémie, a révélé le phénomène de l'interférence. Une évaluation statistique des vaccinations a montré une corrélation très marquée entre la catégorie des « vaccinés deux fois » et celle des « pas tombés malades ». Le critérium χ^2 indique que la probabilité de cette corrélation comme étant simplement accidentelle est insignifiante, étant $< 0,0001$. Nous pouvons donc supposer — avec un très haut degré (99,99 p. 100) de probabilité — que la vaccination par deux injections assure une protection totale contre la maladie.

On a procédé aussi à une étude sérologique de l'épidémie : 12 souches de virus grippal A ont été isolées des malades. Les souches de Lodz ont été, en ce qui concerne leur caractère antigène, semblables aux souches isolées en cette région en 1953.

Des épreuves sérologiques ont montré qu'on trouve dans le sang des malades la plus grande concentration des anticorps pour le virus grippal A¹.

En nous basant sur ces épreuves nous pouvons dire que nous avons obtenu des résultats satisfaisants. Si on prend en considération le fait que dans la prophylaxie spécifique des autres maladies infectieuses (par exemple la fièvre typhoïde et la diphtérie) la vaccination en masse a réduit l'incidence de ces maladies de deux à trois ou de quatre à six fois respectivement, on peut, en effet, envisager une diminution quadruple comme un résultat satisfaisant.

En 1954, on a procédé à des recherches ultérieures sur l'efficacité des vaccins antigrippaux. La campagne de vaccination a été organisée de la même manière que l'année précédente, mais cette fois dans quatre centres : à Varsovie, Lodz, Gdansk et Cracovie. De même qu'en 1953, on a employé pour les vaccinations deux espèces de vaccin : a) un vaccin condensé au moyen d'adsorption et d'élution sur globules rouges ; b) un vaccin condensé par l'hydrate d'alumine. Pour la production du vaccin les souches suivantes ont été choisies :

A. — Zys, Warszawa	1953
A. — Pan, Moskova	1952
A. — L5, Lodz	1954
A. — L6, Lodz	1954
B. — Kri, Moskova	1949
B. — Bratislava	1947

Le vaccin était introduit par la voie nasale deux fois à chaque sujet vacciné. On se servait d'un pulvérisateur. Chaque dose contenait 0,5 ml. En tout, 170 000 personnes (deux injections chacune) furent vaccinées. Les résultats obtenus, exposés sur le tableau I, ont trait à 65 637 personnes (34 516 vaccinées et 31 121 non vaccinées), dont l'état de santé était strictement contrôlé.

Tous les calculs présentés ci-dessus avaient pour base des groupes uniformes de la population travaillant et vivant dans des conditions semblables. Il en résulte que dans des localités différentes, en appliquant le même vaccin, on obtient des indices différents. Cela dépend peut-être des conditions dans lesquelles les expériences étaient réalisées, ainsi que de l'exactitude plus ou moins grande des observateurs. Il paraît que le vaccin élué est plus efficace que le vaccin à l'hydrate d'alun.

Aux mois de mars et avril 1955, une épidémie de grippe est survenue, causée par le virus B. On a isolé, dans des centres différents, 4 souches du virus B, et les épreuves sérologiques

(fixation du complément) indiquèrent une augmentation très nette des anticorps neutralisant le virus grippal B.

L'évaluation du vaccin antigrippal a été exécutée au cours de

TABLEAU I.

	Index de la diminution de l'incidence	
	Vaccin élué	A l'hydrate d'alun
Ecoles	1,3 - 2,9	1,3 - 2,7
Etablissements de travail	1,8 - 3,1	1,1 - 4,4
Hôtellerie pour étudiants	2,5 - 4,2	1,2 - 1,6
Ecoles de Médecine	1,4 - 2,0	1,4 - 2,7
Hôtellerie pour ouvriers	4,6	1,2

deux saisons (1953-1954 et 1954-1955). En 1953-1954, l'incidence de la grippe a diminué chez les vaccinés de deux à quatre fois pendant des épidémies provoquées par le virus A. En 1954-1955, pendant une épidémie de la grippe B, l'incidence chez les vaccinés est tombée près de deux fois en moyenne. De nouvelles recherches sur l'efficacité des vaccins antigrippaux sont en cours.

TYPHUS EXANTHÉMATIQUE SPORADIQUE EN POLOGNE

par JAN KOSTRZEWSKI.

(Institut National d'Hygiène, Varsovie)

Après la deuxième guerre mondiale on a entrepris, en Pologne, des recherches sur l'étiologie et l'épidémiologie du typhus exanthématique sporadique. On a commencé par établir les bases du diagnostic sérologique (Wojciechowski, 1949 ; Kozrzewski et Szufa, 1951 ; Wojciechowski et Lewinska, 1955). Au cours de recherches ultérieures sur la clinique et l'étiologie de la maladie, on a constaté qu'elle avait un caractère bénin et souvent atypique. Les souches isolées correspondaient, du point de vue sérologique et biologique, à celles de *Rickettsia prowazeki* (Kozrzewski, 1953 ; Wojciechowski et Mikolajczyk, 1953).

On a examiné 6 souches, isolées de cas sporadiques, dont 3 provenaient de malades atteints pour la deuxième fois. Ces travaux préliminaires permirent de formuler les conclusions suivantes, ainsi que d'établir des directives pour les recherches ultérieures.

1° Du point de vue clinique, le typhus exanthématique sporadique est souvent atypique ; quelquefois la période de fièvre ne dépasse pas sept à dix jours, l'éruption peut être peu abondante et peu caractéristique, ou bien faire complètement défaut. L'image hématologique diffère des descriptions classiques, car au lieu d'une leucocytose modérée apparaît quelquefois une leucopénie combinée à de la lymphocytose comme dans la fièvre typhoïde.

Il arrive bien souvent que les malades disent avoir déjà été atteints de typhus exanthématique il y a quelques années.

Vu le caractère du typhus exanthématique en Pologne, on a adopté pour principe de soupçonner son existence chez tous les malades dont la fièvre dure plus de sept jours, si la cause de cette fièvre reste non déterminée.

2° La réaction de Weil-Félix (*Proteus* OX19) n'est pas un critère suffisant pour le diagnostic du typhus exanthématique sporadique, parce que 50 p. 100 environ des malades présentent une réaction de Weil-Félix négative ou bien au-dessous de 1 : 200. Le diagnostic sérologique doit donc être fondé sur la réaction de

fixation du complément avec *Rickettsia prowazeki* comme antigène, ou bien sur la réaction d'agglutination de *Rickettsia prowazeki*.

3° Dans l'étude épidémiologique il faut tout particulièrement tenir compte des sujets atteints de typhus exanthématique pour la deuxième fois, sources possible de virus pour les nouveaux foyers.

ÉPIDÉMIOLOGIE DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE SPORADIQUE EN POLOGNE AU COURS DES ANNÉES 1952-1954.

Méthodes. — Les critères du diagnostic clinique du typhus exanthématique sporadique furent adressés à tous les hôpitaux pour contagieux en Pologne.

On a organisé la production des antigènes *Rickettsia prowazeki* pour la réaction de fixation du complément, recommandée à tous les laboratoires centraux pour le diagnostic du typhus exanthématique. L'analyse détaillée, du point de vue clinique et épidémiologique, de chaque cas de typhus exanthématique, conformément à l'enquête élaborée à l'Institut d'Hygiène de Varsovie, a été rendue obligatoire. Ces enquêtes constituent le matériel fondamental pour l'étude épidémiologique.

Résultats. — L'étude a porté sur tous les cas de typhus exanthématique bénin observés sporadiquement en Pologne au cours des années 1952-1954. Parmi les sujets atteints de typhus exanthématique rapportés au cours de ces années, 304 (39,6 p. 100) l'étaient pour la deuxième fois. On a divisé tous les cas, aussi bien sporadiques qu'épidémiques, apparus dans le pays, en trois groupes épidémiologiques différents.

Le premier groupe comprend les cas épidémiques pour lesquels a été découverte la source de contagion. Les cas d'infection de laboratoire sont compris dans ce groupe.

Le second groupe comprend les cas pour lesquels la source de contagion ne put être établie. Furent compris dans ce nombre les malades porteurs de poux ou ayant des porteurs de poux dans leur entourage. Figurent également dans cette catégorie des malades qui, quatre semaines avant le début de leur maladie, avaient quitté leur domicile et qui, au cours du voyage, avaient pu avoir des contacts avec un malade atteint de typhus exanthématique.

Le troisième groupe est constitué par des malades chez lesquels la possibilité d'une infection venant du dehors était à rejeter. Dans leur entourage n'existait aucun cas suspect de typhus exanthématique ; en outre, ni sur ces malades, ni sur les personnes en contact avec eux, on n'a trouvé de poux. Ces malades, dans

les quatre semaines qui ont précédé le début de leur maladie, n'ont point voyagé et n'ont pas été en contact avec des typhiques ou avec des poux vecteurs de typhus exanthématique.

Enfin, dans un quatrième groupe, furent réunis tous les malades ayant subi une deuxième atteinte de typhus exanthématique, et qui figurent parmi les deuxième et troisième groupes formés au cours des années 1952, 1953 et 1954.

Notre enquête a montré que le pourcentage des cas pour lesquels on a réussi à trouver la source de contagion diminue

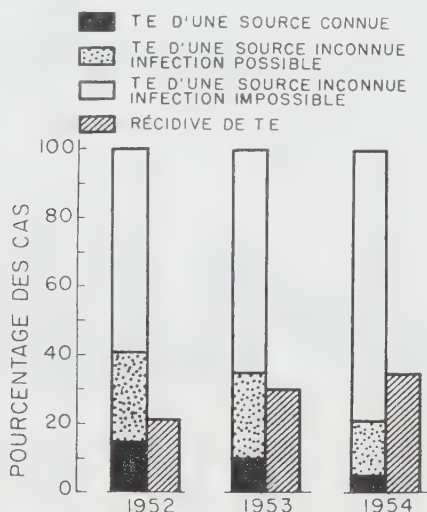


FIG. 1. — Typhus exanthématique en Pologne de 1952 à 1954.

d'année en année. En 1954 il était de 5,9 p. 100 seulement. Les malades pour lesquels la possibilité d'une contagion venant du dehors était exclue forment 70,8 p. 100 des cas. Le pourcentage des deuxième atteintes augmente d'année en année ; ainsi, en 1954, il s'élevait à 45,2 p. 100 du nombre total des cas (fig. 1).

Durant les trois années il n'y a pas eu un seul cas de deuxième atteinte parmi les malades pour lesquels la source de contagion put être établie, alors que 95,1 p. 100 de cas de ce genre furent dénombrés parmi les malades chez lesquels une contagion du dehors pouvait être exclue. Ceci confirme l'hypothèse de Zinsser, d'après laquelle les deuxième atteintes du typhus exanthématique ne sont que les récidives de la même maladie.

On a constaté une influence saisonnière très nette sur la fré-

quence des cas de la maladie dans les quatre groupes (fig. 2). Cette influence est frappante en ce qui concerne les cas à source de contagion établie ou probable. Le nombre des cas commence à augmenter en automne et atteint son maximum à la fin de l'hiver. La courbe des cas de deuxième atteinte a une allure toute différente. Nous en trouvons le plus grand nombre en été et au début de l'automne, quand les cas de typhus exanthématique épidémique sont le moins fréquents. Il en va de même pour les cas où une contagion du dehors est à exclure.

La marche des courbes saisonnières explique la cause de

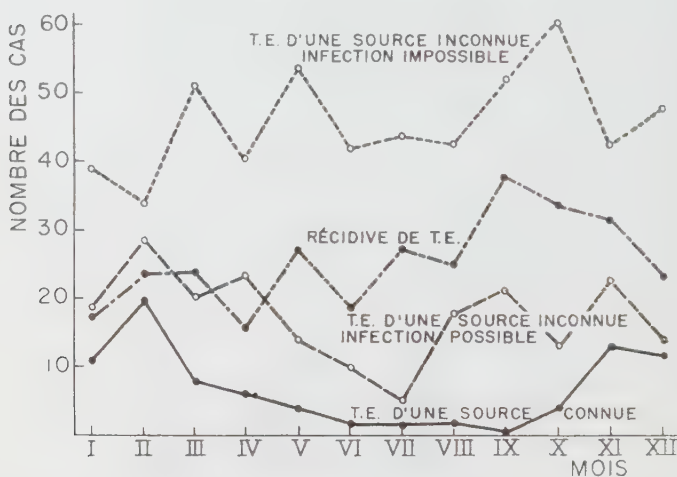


FIG. 2. — Typhus exanthématique en Pologne de 1952 à 1954.

l'apparition des foyers épidémiques du typhus exanthématique en automne. Mosing, Radlo et Saryk l'ont expliquée autrefois par la survie du virus dans les crottes de poux desséchées ; à présent, il faudrait l'expliquer par l'exacerbation des récides du typhus exanthématique durant l'été et l'automne. En été, les conditions de vie de la population ne favorisent pas l'expansion épidémique de la maladie, mais à l'arrivée de la saison froide, les conditions changent et favorisent l'apparition des foyers épidémiques.

D'autre part, on constate des différences caractéristiques dans les quatre groupes d'après l'âge des malades (fig. 3). 71 p. 100 des malades dont la source de contagion est connue n'ont pas atteint 30 ans, alors qu'il y en a 11 p. 100 seulement parmi les

récidives et que 73 p. 100 de ces derniers malades ont dépassé la quarantaine.

On a remarqué que le nombre des cas de typhus change d'après le lieu d'habitation. Ainsi 86 p. 100 des malades dont la source de contagion est connue habitent la campagne ; 14 p. 100 d'entre eux seulement sont des citadins ; c'est dans les villes qu'on trouve la plupart des cas de contagion de laboratoire. Par contre, on a enregistré plus de malades atteints pour la deuxième fois à la ville (64 p. 100) qu'à la campagne (36 p. 100). Ces der-

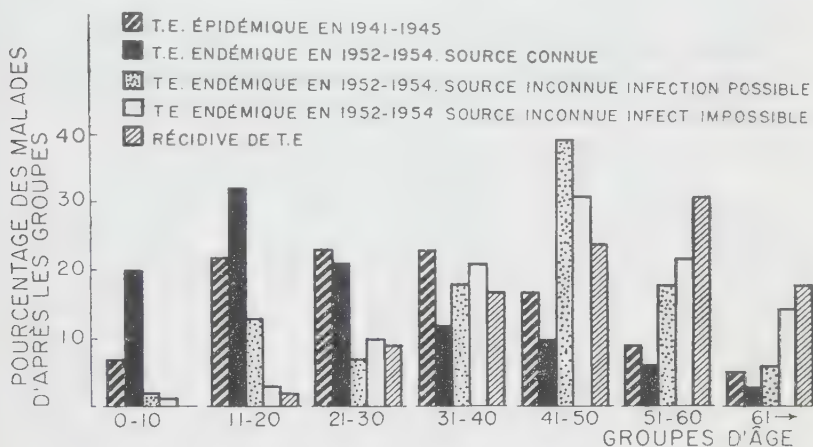


FIG. 3. — Typhus exanthématique épidémique et endémique en Pologne en 1941-1945 et 1952-1954.

niers chiffres traduisent les possibilités de diagnostic meilleures et le dépistage plus poussé dans les centres urbains.

La répartition de malades d'après leur profession montre que les agriculteurs forment 45 p. 100 des cas épidémiques ; ils sont la majorité des malades à source de contagion connue. Par contre, les retraités et les ménagères (27 p. 100), les travailleurs intellectuels et manuels (23 p. 100) constituent la majorité des malades atteints pour la deuxième fois. Ce sont des personnes qui ont le moins d'occasions d'être infectés par leur entourage. Ces groupes constituent au total 50 p. 100 de toutes les récidives du typhus exanthématique.

Quant au diagnostic sérologique, il résulte du tableau I que la récidive du typhus exanthématique est caractérisée par un taux en général très bas de la réaction de Weil-Félix ou même par une réaction négative (56 p. 100). Le groupe de malades chez les-

quels la possibilité de contagion est exclue, donne presque le même pourcentage de réaction négatives de Weil-Félix que les récidives. Cela semble montrer que le caractère de la maladie est le même dans ces deux groupes. Parmi les malades pour lesquels une contagion n'a pu être démontrée, mais est néanmoins possible, le pourcentage des cas à réaction Weil-Félix négative est élevé (38,7 p. 100), mais inférieur à celui qu'on relève parmi les deux groupes précédents. S'appuyant sur ces données, on peut estimer que la majorité des cas dans ce groupe correspondent par leur caractère aux récidives du typhus exanthématique.

TABLEAU I. — Typhus exanthématique en Pologne au cours des années 1952-1954. Cas confirmés par les réactions sérologiques, celle de Weil-Félix d'un titre de 1/200 et plus, celle de fixation du complément avec *R. prowazeki* d'un titre de 1/50 et plus.

	T. E. d'une source connue.	T. E. d'une source inconnue. Infection possible	T. E. d'une source inconnue. Infection impossible	Récidives de T. E.
R de WEIL-FELIX et fixation du complément	47 63,5 %	84 43,3 %	213 40,4 %	115 39,0 %
R de WEIL-FELIX seule	21 28,4 %	35 18,0 %	41 7,8 %	13 4,4 %
R. fixation du complément seule	6 8,1 %	75 38,7 %	273 51,8 %	167 56,6 %
Au total	74 100 %	194 100 %	527 100 %	295 100 %

tique ; il s'y trouve cependant un certain nombre de malades qui subirent la contagion par l'intermédiaire du pou. Pour 92 p. 100 des malades, dont la source d'infection est connue, le diagnostic fut confirmé par la réaction de Weil-Félix.

Dans environ 50 p. 100 de tous les cas de typhus sporadique, il s'agit de récidive. La question qui se pose est donc de savoir quelle est la cause des autres cas de typhus sporadique. Une partie de ces cas sont sans doute eux aussi des récidives, car le malade ne se rend pas toujours compte qu'il a été dans le passé atteint du typhus exanthématique. La première atteinte de la maladie peut avoir été très légère ou s'est produite durant la première enfance. Il faut cependant admettre la possibilité d'une infection typhique sans symptômes manifestes, acquise autrefois, conformément aux conceptions de Nicolle, de Ramsine, Barykin et d'autres. Une telle infection inapparente pourrait être à l'origine d'une longue période d'infection chronique, latente, laquelle,

après quelques années ou après quelques dizaines d'années, s'extériorise comme maladie. S'il est difficile d'affirmer l'existence d'une telle période de latence, de nombreux indices militent cependant en sa faveur

Il faut encore soulever l'éventualité d'une récurrence chez des sujets immunisés par les vaccins de Weigl, de Durand et Giroud, de Cox, ou par un autre vaccin à base de virus tué. Comme nous le savons, l'immunité obtenue par ces vaccins ne donne pas une garantie absolue contre la contagion. De même, les récurrences de typhus exanthématique sont possibles chez des sujets vaccinés. De telles récurrences du typhus exanthématique ont été observées en Pologne et dans la littérature médicale on a trouvé la description d'un cas semblable par Holler et Kollert.

Prévision des récurrences du typhus exanthématique.

Nous avons fait l'analyse statistique des récurrences du typhus exanthématique venues à notre connaissance au cours des années 1953-1954. Cette analyse nous a permis d'éclaircir les causes de l'augmentation du nombre des cas de la maladie au cours des années 1930-1935, dans les pays où l'épidémie avait sévi pendant la première guerre mondiale (Kostrzewski, Gruzewski et Adonajlo, 1953).

Par l'analyse de 583 cas de récurrences du typhus exanthématique décrits dans la littérature médicale, principalement soviétique, il a été possible de montrer que la grande majorité des récurrences se produisent au bout de dix à vingt ans. En nous basant sur ces observations, nous avons calculé à quelle période devait apparaître en théorie une vague de récurrences du typhus exanthématique consécutive à la grande épidémie en Pologne durant la première guerre mondiale. La courbe théorique ainsi établie (fig. 4) se montra conforme à celle qui enregistre les cas de typhus qui se sont produits au cours des années 1930-1938. Les calculs effectués dans d'autres pays, comme par exemple l'Égypte, l'U. R. S. S., l'Ukraine et la Yougoslavie, ont confirmé cette constatation (fig 5 et 6).

Par analogie avec ce qui s'est passé en 1930-1938, on peut supposer qu'après l'épidémie de la deuxième guerre mondiale, un certain nombre d'atteintes typhiques secondaires feront leur apparition. Les calculs théoriques permettent de supposer que le nombre de cas sporadiques ira en augmentant en Pologne de 1951 à 1956 et 1957 (fig. 7). L'enregistrement des cas de maladie au cours des années 1952-1954 semble confirmer ces prévisions théoriques. On peut donc supposer que la recrudescence du nombre de récurrences du typhus exanthématique atteindra égale-

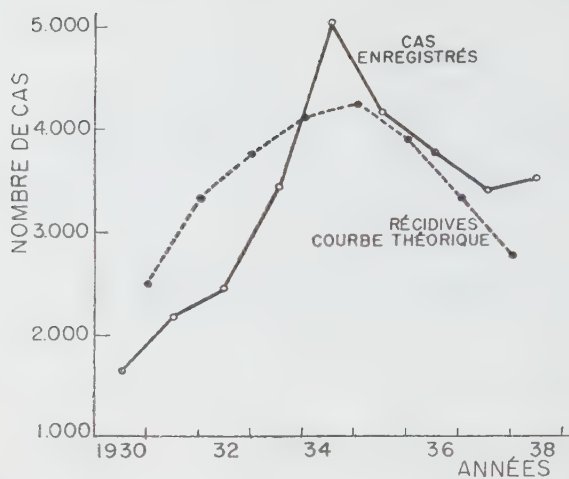


FIG. 4. — Typhus exanthématique en Pologne en 1930-1938.

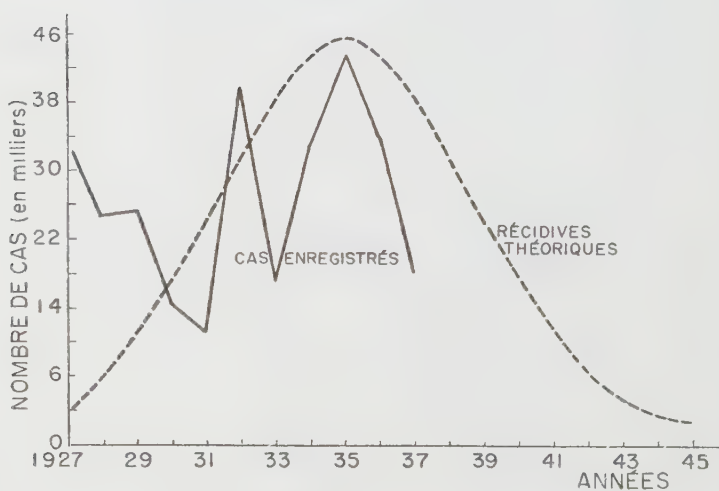


FIG. 5. — Typhus exanthématique en U.R.S.S.

ment d'autres pays où l'épidémie a sévi au cours de la deuxième guerre mondiale. C'est en effet ce qui se passe en Yougoslavie, en Hongrie et en Tchécoslovaquie, où des cas de typhus exanthématique réapparurent ou augmentèrent en nombre au cours

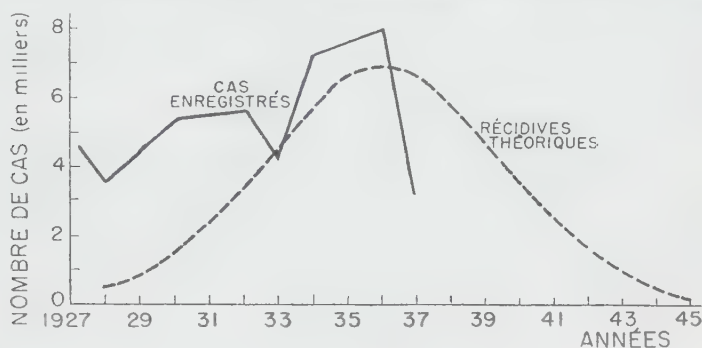


FIG. 6. — Typhus exanthématique en Ukraine.

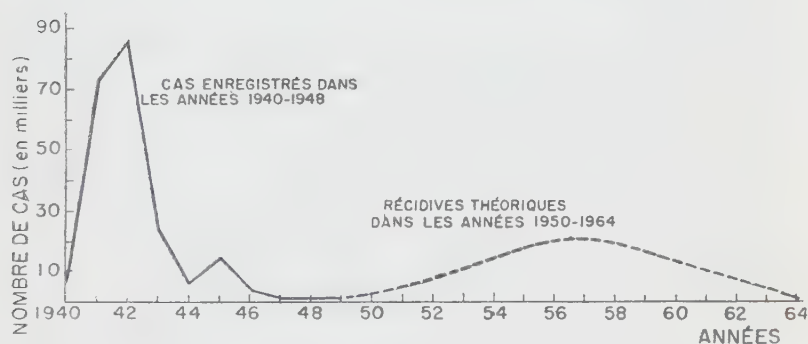


FIG. 7. — Typhus exanthématique en Pologne de 1940 à 1954.

des dernières années. Un phénomène analogue se produira probablement dans les pays d'Europe occidentale.

CONCLUSIONS.

Seul un bon diagnostic clinique et sérologique permettra de connaître la fréquence réelle du typhus exanthématique.

Etant donné que des récidives du typhus exanthématique peuvent se produire même cinquante ans après une première atteinte de la maladie, la liquidation complète du typhus exan-

thématique semble impossible au cours des prochaines années.

Seule la lutte énergique contre les poux peut empêcher l'extension épidémique de la maladie, la liquidation complète des premiers rendant possible celle du typhus.

Il est recommandé de prévenir le typhus exanthématique par les vaccinations prophylactiques, mais il faudrait tendre à remplacer les virus tués employés jusqu'à présent, par des vaccins préparés à partir d'une souche vivante non virulente, *à priori* plus efficaces (souche « E », Everitt, Fox ?).

Il serait utile d'entreprendre des études sur l'infection chronique latente dont peuvent être porteurs des sujets ayant contracté autrefois le typhus exanthématique. Les résultats obtenus dans ce domaine pourraient accélérer la liquidation complète du typhus exanthématique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARYKIN, MINERWIN et KOMPANEEZ. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 1930, **19**, 422.
- [2] EVERITT (M. G.), BHATT (P. N.) et FOX (J. P.). *Amer. J. Hyg.*, 1954, **59**, 60.
- [3] GRUZEWSKI (A.). *Przegl. Epid.*, 1953, **7**, 33.
- [4] HOLLER (G.) et KOLLERT (G.). *Wien. med. Wschr.*, 1953, **103**, 650.
- [5] KOSTRZEWSKI (J.). *Przegl. Lek.*, 1947, **3**, 286.
- [6] KOSTRZEWSKI (J.) et SZUFA (M.). *Przegl. Lek.*, 1951, **7**, 139.
- [7] KOSTRZEWSKI (J.). *Pol. Tyg. Lek.*, 1953, **8**, 8.
- [8] KOSTRZEWSKI (J.). *Przegl. Epid.*, 1953, **7**, 15.
- [9] KOSTRZEWSKI (J.), GRUZEWSKI (A.) et ADONAJLO (A.). *Przegl. Epid.*, 1953, **3**, 197.
- [10] MOSING (H.). *Med. Dosw. Spol.*, 1937, **22**, n^{os} 5-6.
- [11] MOSING (H.). *Bull. Off. Intern. Hyg. Pub.*, 1937, **29**, 708.
- [12] MOSING (H.). *Med. Dosw. Spol.*, 1938, **23**, 217.
- [13] MOSING (H.) et RADLO (P.). *Zdrowie Publ.*, 1938, 637.
- [14] NICOLLE (Ch.) et LEBAILLY (Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1919, p. 48.
- [15] NICOLLE (Ch.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1934, **23**, 19.
- [16] RAMSINE (S.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1929, **18**, 247.
- [17] STARZYK (J.). *Przegl. Epid.*, 1948, **2**, 257.
- [18] WOJCIECHOWSKI (E.). *Przegl. Epid.*, 1949, **4**, 373.
- [19] WOJCIECHOWSKI (E.) et MIKOLAJCZYK (E.). *Przegl. Epid.*, 1953, **7**, 187.
- [20] WOJCIECHOWSKI (E.) et LEWINSKA (Z.). *Przegl. Epid.*, 1955, **9**, 21.

A PROPOS DES SOUCHES DE *CLOSTRIDIUM SORDELLII* ET LEURS TOXINES

par HENRYK MEISEL.

(Institut d'Hygiène d'Etat, Varsovie)

Les problèmes de la structure antigénique des *Clostridia* sont moins connus que ceux des bactéries aérobies. Je voudrais profiter de l'occasion pour rendre compte de quelques recherches, faites dans notre Institut à Varsovie, sur les souches de *Cl. sordellii* (H. Meisel, P. Trembowler, H. Albrycht).

Nous nous sommes servis pour nos expériences de trois souches *Cl. sordellii* : une souche n° 82 de l'Institut Pasteur à Paris, une souche isolée par Sordelli en 1921 et reçue de l'Institut Tarasiewicz à Moscou et une souche reçue du professeur Patocka de Prague, sans désignation spéciale, mais provenant de la collection Pasteur à Paris. Dans notre rapport, nous nommons la première souche SP, la seconde SM et la troisième SC.

Les colonies des souches SP et SC sur gélose au sang sont typiques. Les colonies de la souche SM sur ce milieu sont larges et plates, leur surface est rugueuse, les bords irréguliers. La culture de la souche SM en milieu liquide forme assez rapidement un dépôt. Les suspensions en eau physiologique des trois souches ne montrent pas d'auto-agglutination.

Les propriétés fermentatives et protéolytiques. — Elles sont identiques pour les trois souches et conformes aux propriétés considérées comme typiques. Les tests de l'indole et de l'uréase sont positifs.

Les propriétés sérologiques. — Nous avons préparé des sérums agglutinants de lapins immunisés. Pour l'immunisation, nous nous sommes servis de suspensions en eau physiologique de bacilles centrifugés, lavés et tués au formol à 1 p. 100. Pour les réactions d'agglutination nous avons employé des cultures de dix-huit heures en bouillon ou des suspensions en eau physiologique de bacilles lavés. Les tubes étaient incubés pendant quatre heures à l'étuve à 37° et ensuite laissés à la température du laboratoire jusqu'au lendemain. Le tableau I montre les résultats de toutes les réactions d'agglutination. Nous voyons qu'il existe une différence entre les souches SP et SC d'une part et la souche SM

d'autre part. Chaque sérum SP et SC agglutine les deux souches SP et SC, mais n'agglutine pas la SM. Au contraire, le sérum SM agglutine la souche homologue et les deux souches SP et SC. Le sérum de lapin non immunisé n'agglutine les trois souches que jusqu'à la dilution 1 : 40.

Le sérum SM, après avoir été absorbé par l'antigène SM, perd son pouvoir agglutinant vis-à-vis de sa souche homologue, mais ne le perd pas vis-à-vis des souches typiques *sordellii*. Le

TABEAU I. — Réactions d'agglutination des souches *Cl. sordellii*.

Antigène Sérum	SP	SC	SM
SP	640	640	0
SC	2.560	2.560	0
SM	1.280	640	1.280

Les chiffres indiquent la plus haute dilution du sérum qui réagit positivement ; 0 = agglutination négative à partir de 1 : 40.

sérum SM, absorbé par les souches typiques, agglutine seulement la souche homologue SM. Nous voyons que la structure antigénique de la souche SM atypique diffère de celle des deux souches typiques SP et SC. La souche atypique possède deux antigènes, c'est-à-dire un antigène commun à toutes les formes typiques et l'autre, spécifique seulement pour elle-même. Les souches typiques ne possèdent qu'un seul antigène.

L'antigène spécifique, toxique, soluble, non hémolytique. — L'étude de la toxine spécifique non hémolytique nous a révélé une autre différence caractéristique parmi les souches *sordellii*. Cette toxine est bien connue comme le facteur léthal. Mais elle possède en plus une propriété nécrosante. Nous avons pour cette raison injecté la toxine chez la souris blanche par voie sous-cutanée et en même temps chez le cobaye par voie intradermique. Les souris ainsi inoculées restaient en observation durant quatre-vingt-seize heures et le moment de leur mort était noté. Le titrage de la toxine par voie intradermique était effectué sur 2 ou 4 cobayes simultanément. Nous avons noté le diamètre moyen de la nécrose (et non celui de l'œdème) comme indicateur de l'activité de la toxine.

Le résultat d'une expérience sur les souris blanches est présenté sur le tableau II. On voit que les souches SP et SC produisent une toxine d'une activité plusieurs fois supérieure à celle de la souche SM. En effet, les toxines SP et SC agissent en dilution 1 : 1 500 et la toxine SM en dilution 1 : 100 seulement. Ces

TABLEAU II. — Toxines *Cl. sordellii*, tests sous-cutanés.

Dilution de la toxine	SP	SM	SC
1/100	+	+	+
1/1000	+	—	+
1/1500	+	—	+
1/2000	—	—	—

+ = mort de toutes les souris pendant l'observation.

— = aucune souris morte.

TABLEAU III. — Toxines *sordellii*, tests intradermiques.

Dilution de la toxine	SP	SM	SC
1/100	12 × 13*	8 × 9	8 × 7
1/200	11 × 10	6 × 6	7 × 7
1/400	10 × 10	2 × 2	6 × 6
1/800	9 × 10	—	6 × 6
1/1600	8 × 8	—	5 × 5
1/3200	6 × 4	—	3 × 2

*) Diamètre de la nécrose en millimètres après quarante-huit heures.

expériences, plusieurs fois répétées, ont toujours donné les mêmes résultats.

Les réactions nécrotiques sur le tégument du cobaye sont représentées sur le tableau III. On voit que la souche SM est une faible productrice de toxine. Les toxines SP et SC provoquent de la nécrose en dilution 1 : 1 600-1 : 3 200, alors que la toxine SM agit seulement en dilution 1 : 200-1 : 400.

L'activité des trois souches était neutralisée par le sérum standard provenant de Copenhague.

Nous avons préparé, en partant de lapins immunisés, des sérums antitoxiques correspondant aux trois toxines. Des cobayes regurent dans le derme des mélanges de toxine et de sérum antitoxique. Nous avons d'abord déterminé la dose minime nécrotisante de chaque toxine. Nous avons constaté que chaque sérum de lapin immunisé, dilué au 1 : 1 600-1 : 3 200, était capable de neutraliser 10-20 d. m. de chaque toxine. Il ne parut exister aucune différence entre les trois sérums SP, SC et SM quant à leur spécificité et leur pouvoir neutralisant.

On doit souligner que les souches *sordellii* produisent cette toxine en bouillon glucosé et en bouillon non glucosé à pH 7,0. Cependant, la toxine produite en milieu non glucosé est toujours plus faible.

Il résulte de nos expériences que la toxine produite par les trois souches examinées est qualitativement identique. La souche atypique SM produit seulement moins de toxine que les deux souches typiques. La présence d'un autre antigène toxique, soluble dans les cultures de la souche SM, ne fut jamais constatée. La souche atypique produit sa toxine dans les mêmes conditions que les souches typiques.

Lécithinase. — Il est bien connu que *Cl. sordellii* produit encore un autre antigène soluble, la lécithinase. La production de cet enzyme fut examinée en deux milieux nutritifs : en bouillon sans glucose et en bouillon additionné de 0,8 p. 100 de glucose. On choisit ici cette haute concentration de glucose, comme dans les expériences précédentes, pour mettre en évidence d'éventuelles variations. Dans chaque tube de 200 x 20 mm furent introduits 40 cm³ du milieu (300 cm³ dans des flacons d'Erlenmeyer), couvert d'une couche d'huile de paraffine. Après stérilisation, le pH était d'environ 7,0. Les milieux étaient inoculés avec une jeune culture en bouillon-foie et incubés à 37°. Toutes les vingt-quatre heures des échantillons furent prélevés pour évaluer la production de l'enzyme. Des tests à la lécithovitelline et des tests hémolytiques furent exécutés parallèlement, mais seuls les résultats du premier test seront décrits dans cette Note. De nombreuses expériences ont montré, en effet, que le test LV est le plus précis et le plus fidèle. Avant le titrage, les cultures en bouillon étaient centrifugées.

Le tableau IV montre la marche d'une de ces expériences. On constate l'apparition de la lécithinase dans les deux milieux dans lesquels se développe *Cl. sordellii*. Le titre moyen de la lécithinase produite par les trois souches *Cl. sordellii* est le même. Il est inférieur à celui de *Cl. welchii*.

Les expériences que nous venons de décrire nous permettent de conclure que la souche *sordellii* atypique SM est caractéristique par la formation d'un nouvel antigène insoluble, la diminution du pouvoir à former une toxine spécifique léthale et nécrosante, et la production régulière de lécithinase.

TABLÉAU IV. — Les cultures de *Cl. sordellii* en bouillon BHI, pH 7,0.

	sans glucose		0,8% de glucose	
	DMA *) ml	pH +)	DMA ml	pH
SP	0,1 0,1 —	6,25 6,75	0,015 0,02 0,015	5,45 5,5
SM	0,02 0,02 —	6,25 6,55	0,02 0,02 0,01	5,35 5,55
SC	0,01 0,01 —	6,3 6,6	0,05 0,05 0,05	5,5 5,6

*) DMA = dose minime active, LV réaction après vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures d'incubation.

+) = pH après vingt-quatre et quarante-huit heures d'incubation.

—) = LV réaction négative.

Le test LV permet de constater que non seulement la production de lécithinase par *Cl. sordellii* est en général plus active en milieu glucosé, mais peut même être de dix à vingt fois supérieure à celle des cultures en milieu non glucosé.

Le test LV, effectué jour par jour durant une période d'incubation de dix jours, montre que cet enzyme disparaît de la culture de *Cl. sordellii* en bouillon simple après environ quarante-huit heures. En bouillon glucosé, la lécithinase reste longtemps présente et son titre relativement élevé.

Par conséquent, le glucose semble devoir être considéré alors comme un facteur stimulant la production de lécithinase pour les souches de *Cl. sordellii*.

Le sérum antitoxique *welchii* neutralise l'activité de la lécithinase *sordellii*. Il était intéressant de montrer les conditions de la production de la lécithinase par *Cl. welchii*, car il est connu que les deux lécithinases, celle de *Cl. welchii* et de *Cl. sordellii* possèdent une certaine parenté antigénique.

Nous avons étudié la production de la lécithinase par quatre souches *Cl. welchii* type A. Cultures en bouillon simple et en bouillon glucosé étaient examinées simultanément. Les doses minimum actives furent calculées d'après la moyenne de

10 tests LV. Toutes les souches de *Cl. welchii* s'avéraient fortes productrices de lécithinase dans les milieux non glucosés. L'image change quand le milieu est additionné de glucose : la souche SR12 ne produit point d'enzyme, les souches BP6K et Lechien en produisent considérablement moins, la souche F3 fait exception, produisant dans les deux milieux une toxine, en général de la même valeur.

Les résultats du test LV pour les deux groupes de bactéries examinées indiquent que le glucose ne joue pas le même rôle chez l'un et chez l'autre. Il a une influence stimulante chez *Cl. sordellii*, alors que pour *Cl. welchii* la production de la lécithinase ne dépend pas du glucose qui entrave même parfois la production de cet enzyme.

Ces dernières constatations s'accordent avec celles de Logan et coll. qui ont démontré l'inefficacité du glucose pour stimuler la production de la toxine α chez *Cl. welchii* et ont proposé le remplacement du glucose par la dextrine. Adams, Hendee et Pappenheimer, de leur côté, ont vu que les sucres simples, comme le glucose et le saccharose, entravent la production de lécithinase *welchii*, même en présence de dextrine.

Nous nous sommes servi dans nos expériences du bouillon BHI (beaf heart infusion broth) à pH 7,0. Il reste à déterminer le rôle éventuel des hydrates de carbone que contient ce milieu dans la production de lécithinase. Le mode d'action du glucose lui-même, sous ce rapport, n'est pas bien connu. Quoi qu'il en soit, il semble que le mécanisme de production de la lécithinase ne soit pas le même chez *Cl. sordellii* et chez *Cl. welchii*, bien que les deux soient apparentés en tant qu'antigènes.

La question se pose de savoir si l'acidification du milieu est responsable des différences mentionnées. Pour répondre à cette question, nous avons déterminé le pH dans les échantillons, prélevés pour le test LV. Voici les pH constatés :

Dans les cultures de *Cl. sordellii* en bouillon simple, 6,25-6,75.

Dans les cultures de *Cl. welchii* en bouillon simple, 5,96-6,3.

Dans les cultures de *Cl. sordellii* en bouillon glucosé, 5,5-5,6.

Dans les cultures de *Cl. welchii* en bouillon glucosé, 4,6-5,36.

L'acidité des cultures *sordellii* et *welchii* dont le titre lécithinase était le plus élevé était à peu près la même. L'acidité finale des cultures *welchii* s'approchait elle aussi de celle trouvée par Adams, Hendee et Pappenheimer.

En cultivant les *Clostridia* examinés en deux milieux modifiés, nous avons tâché de voir l'influence éventuelle de l'acidité sur la production de lécithinase. Nous avons utilisé à cette fin du bouillon glucosé additionné de carbonate de calcium et du bouillon glucosé tamponné aux phosphates. Le pH initial était

de 7,0, comme toujours. La réaction LV, exécutée après dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation donnait les résultats suivants :

Toutes les souches *welchii* sans exception produisaient dans ces milieux de la lécithinase, à l'opposé de leur comportement en bouillon glucosé non modifié ; nous avons constaté un accroissement accentué de la production de lécithinase *welchii* en bouillon glucosé, additionné de carbonate de calcium ; l'acidité finale était le plus souvent de 5,6-5,8 dans le premier milieu et de 5,0-5,8 dans le second ; les propriétés des cultures *sordellii* en milieux modifiés étaient les mêmes qu'en bouillon glucosé non modifié.

La tendance à faire virer à l'acidité la réaction neutre du milieu est un trait constant des cultures des deux groupes de *Clostridia*. Mais le degré d'acidification et le titre de la lécithinase produite ne marchent pas parallèlement. Il est difficile d'admettre que les deux processus, c'est-à-dire la production de la lécithinase et l'acidification du milieu aient entre eux un rapport direct.

Je voudrais mentionner ici une constatation concernant les cultures en bouillon non glucosé, tamponné aux phosphates, de pH initial 7,0. La croissance de toutes les souches *sordellii* et *welchii* est excellente en ce milieu, mais il n'y a ni production de lécithinase ni acidification du bouillon. Le phénomène de l'action inhibitrice des phosphates sur la production de la lécithinase n'est pas encore élucidé et fera l'objet de recherches futures.

CONCLUSIONS.

Une souche *Cl. sordellii* isolée il y a trente ans et conservée au laboratoire depuis ce temps a montré quelques signes de variabilité. Ses propriétés ont été comparées à celles de deux souches *sordellii* typiques. Les principaux traits caractéristiques de cette souche atypique sont : l'apparition d'un nouvel antigène insoluble à l'intérieur des microbes, la diminution du pouvoir de produire l'antigène spécifique soluble et une production normale de lécithinase.

La toxine spécifique *sordellii* a une activité nécrosante et léthale.

Quelques problèmes concernant la production de la lécithinase par *Cl. sordellii* et *welchii* ont été étudiés et présentés, leurs lécithinases étant antigéniquement très voisines.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS (M. H.) et HENDEE (E. D.). *J. Immunol.*, 1945, **51**, 249.
ADAMS (M. H.), HENDEE (E. D.) et PAPPENHEIMER (A. M.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 701.

- LOGAN (M. A.), TYIELL (A. A.), DANIELSON (I. S.) et GRINER (A. M.).
J. Immunol., 1945, **51**, 317.
- MEISEL (H.), JANCZURA (E.), MEISLOWA (P.), TREMBOWLER (P.) et
ZALESKA (H.). *Med. Doswiadcz. Mikrobiol.*, 1953, **5**, 165 (en
polonais).
- MEISEL (H.) et TREMBOWLER (P.). *Med. Doswiadcz. Mikrobiol.*, 1954,
6, 141 (en polonais).
- MEISEL (H.) et ALBRYCHT (H.). *Med. Doswiadcz. Mikrobiol.*, 1955, **7**, 27
(en polonais).

RECHERCHES SUR LE PROBLÈME DE LA CLASSIFICATION ET DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES *SHIGELLA*

par STEFAN SLOPEK

(Institut d'Immunologie et de Thérapeutique expérimentale
de l'Académie Polonaise des Sciences, Wrocław)

I. — LE PROBLÈME DE LA CLASSIFICATION DES *Shigella*.

Au VI^e Congrès des Microbiologistes Tchécoslovaques à Prague, en 1950, nous avons proposé un projet de classification des *Shigella* qui a été adopté, avec de légères modifications, en Pologne [7 c].

Notre classification ne diffère pas fondamentalement de celle proposée dans « Recommendations of the *Shigella* Commission — Enterobacteriaceae Subcommittee — on the Nomenclature and classification of the Dysentery Bacilli », publiées en 1954 [6].

Cette classification se présente de la façon suivante :

Nous divisons le genre *Shigella* en cinq sous-groupes :

Sous-groupe A : les bacilles mannitol et lactose négatifs sans parenté antigénique réciproque. Ce sous-groupe contient une espèce : *S. shigae*. La séparation de l'espèce *S. shigae* a une justification historique.

Sous-groupe B : ce sont surtout les bacilles mannitol positifs et lactose négatifs montrant une nette parenté antigénique (antigènes de groupe communs) et possédant en outre des antigènes typiquement spécifiques. Ce sous-groupe contient une espèce : *S. flexneri*.

Sous-groupe C : les bacilles mannitol positifs et lactose négatifs, ne contenant pas d'antigènes de groupe caractéristiques pour le sous-groupe B et possédant des antigènes typiquement spécifiques très développés. Ce sous-groupe contient une espèce : *S. boydii*.

Sous-groupe D : les bacilles mannitol et lactose positifs ; contient une espèce : *S. sonnei*.

Sous-groupe E : les bacilles mannitol positifs et lactose négatifs ou positifs ; contient une espèce : *S. castellanii* n. sp. L'apparte-

nance de cette espèce au genre *Shigella* est en général contestée, mais ces bacilles sont très proches des *Shigella*, aussi bien du point de vue biochimique qu'antigénique. Il est vrai que leur rôle étiologique dans la dysenterie n'est pas encore éclairci ; on les trouve pourtant assez souvent chez des sujets atteints de cette maladie.

Le tableau I montre les possibilités de différenciation des espèces de *Shigella* d'après leurs caractères biochimiques et leur structure antigénique.

TABLEAU I.

	SHIGELLA				
	shigae (Syn. S.dysepteriae)	flexneri (Syn. S. paradysenteriae)	boydii (Syn. S. paradysenteriae)	Sonnei	castellanii (Syn. groupe alkalescens-dispar)
Indole	-/+	-/+	-/+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-
KNO ₃	-/+	+	+	+	+
V.P.	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-
Glucose	acide	acide (gaz*)	acide	acide	acide
Lactose	-	-	-	(+)	-/+
Mannite	-	+(-)	+	+	+
Rhamnose	-/+	-/+	-	+	+
Xylose	-	-	-/+	-/+	+
Types antigéniques	types :I - 8 conformes à classification internationale.	types :I - 6 conformes à classification internationale. Variétés antigéniques X et Y	types :I - 11 conformes à classification internationale.	deux phages antigéniquement différents	types :I - 8 conformes à classification internationale.

* *S. flexneri* 6 variétés biochimiques Newcastle et Manchester.

La variabilité antigénique que présentent les *Shigella* paraît être la cause de la discordance qui règne au sujet de leur structure antigénique. Nous mentionnons à ce propos le problème des antigènes typiques des variétés X et Y de *S. flexneri*. Nos observations (Kurylowicz, Slopek [2 a]) faites pendant la dernière guerre et au cours de ces dernières années montrent que, dans des conditions naturelles, il existe des souches qui possèdent un ensemble d'antigènes de groupe des variétés X et Y (types VII et VIII de Weil), en même temps que des antigènes typiquement spécifiques. Il faudrait leur attribuer à tous la même importance

dans le cas des *S. flexneri* 1-6 en tenant compte de la possibilité d'une perte d'antigènes typiques.

II. — LES ESPÈCES ET LES TYPES DE *Shigella* RENCONTRÉS EN POLOGNE.

En 1953, a commencé le contrôle systématique des souches isolées en Pologne et classées comme *Shigella*.

TABLEAU II.

Année	Nombre de souches examinées	S H I G E L L A				
		shigae	flexneri	boydii	sonnei	castellani
1953	1785	0,5	83,6	0	15,9	0,2
1954	2367	0,2	79,9	0	17,5	2,3
1955	2750	0,2	70,7	0	26,3	2,8

TABLEAU III.

<u>S. flexneri</u>	<u>1953</u>	<u>1954</u>	<u>1955</u>
type 1a	1,1	0,5	1,1
1b	3,5	5,6	4,0
2a	80,2	80,6	68,7
2b	.	.	8,2
3	8,0	6,9	6,7
4b	.	0,05	.
4a	5,1	4,5	5,7
5	.	.	.
6	.	0,1	0,4
var. X, type VII(Weil)	0,7	0,5	3,2
var. Y, type VIII(Weil)	1,3	1,2	1,9

Parmi les souches envoyées, nous avons reconnu l'appartenance au genre *Shigella* pour 6 882 d'entre elles, à cause de leurs caractéristiques de culture, biochimiques et antigéniques [5].

La fréquence (en pourcentages) d'espèces particulières de *Shigella*, en Pologne, au cours des années 1953, 1954 et 1955, est présentée dans le tableau II.

S. boydii n'a pas été isolée en Pologne, au cours de ces années.

Le tableau III montre la fréquence (en pourcentages) de types particuliers de l'espèce *S. flexneri*.

Il faut souligner le fait que la majorité des dysenteries bacillaires en Pologne sont dues à *S. flexneri* et *S. sonnei*. Les 4/5 des souches isolées de *S. flexneri* appartiennent au type 2 a.

III. — LES SOUCHES *Shigella* ATYPIQUES.

Dans la littérature (Ewing [1]) on trouve la description de variétés mannitol négatives des types *S. flexneri* 1 b, 2 a, 3, 4 a et 6.

Dernièrement, M. Metzger [4], du Laboratoire de la Dysenterie de l'Institut, a décrit une variété mannitol négative de *S. flexneri* 2 a.

En février 1954, on a isolé des selles d'un individu sain des bacilles Gram-négatifs, immobiles à 20° et à 37°, présentant à l'ensemencement sur gélose le développement et l'odeur caractéristiques des bacilles de la dysenterie (souche n° 1849).

Cette souche acidifiait, sans formation de gaz, le glucose et l'arabinose après vingt-quatre heures, acidifiait tardivement le raffinose (troisième jour), le rhamnose (quinzième jour), ne décomposait pas le xylose, le lactose, le maltose, le saccharose, le mannitol, le dulcitol et le glycérol ; ne produisait pas d'hydrogène sulfuré, ne réduisait pas l'oxyde triméthylamine, ne liquéfiait pas la gélatine, produisait de l'indole. La réaction de Voges-Proskauer était négative, celle au rouge de méthyle, positive.

Les recherches sérologiques (absorption croisée, agglutination dans le sérum spécifique pour le type) ont montré que du point de vue de la structure antigénique cette souche est identique au type *S. flexneri* 2 a.

Les propriétés biochimiques et sérologiques de cette souche n'ont pas subi de changement au cours de plusieurs mois.

En examinant la structure antigénique des bacilles *S. alkalescens*, nous avons rencontré [7 a, 7 b, 3] des souches contenant un antigène somatique identique à celui de *S. alkalescens* mais s'en distinguant morphologiquement (cils) et biochimiquement (fermentation acide du lactose, caillage du lait et réduction du tournesol).

Toutes les souches examinées montraient de vifs mouvements propres, surtout à la température du laboratoire ; à 37° les mouvements étaient beaucoup plus faibles ou même absents. Le développement de ces cultures était, lui aussi, beaucoup plus exubérant à la température du laboratoire qu'à l'étuve à 37°.

On n'a pas constaté d'autres différences que la fermentation du lactose, le caillage du lait et la réduction du tournesol.

Les examens sérologiques (absorption croisée, agglutination dans le sérum spécifique pour le type) ont prouvé l'identité des antigènes somatiques des *S. alkalescens* typiques et atypiques.

Les bacilles atypiques se distinguent de *S. alkalescens* typique par l'absence de parenté antigénique avec les bacilles *S. flexneri* et par leur lyse sous l'influence d'un bactériophage polyvalent de *S. shigae*, *S. flexneri* et *S. sonnei*.

Les examens, repris chaque trimestre pendant trois ans, n'ont révélé aucune variabilité de ces propriétés.

IV. — LA PARENTÉ ANTIGÉNIQUE DES *Shigella* AVEC D'AUTRES BACILLES DE LA FAMILLE DES *Enterobacteriaceae*.

Au cours des recherches sur la structure antigénique des *Shigella* et sur leur parenté antigénique avec les autres bacilles intestinaux, nous avons remarqué avec Kurylowicz [3 a] que certains types de *S. flexneri* (surtout les types I et II) agglutinent avec les sérums anti-*Salmonella*, *paratyphi C*, *Salmonella suipestifer* var. *kunzendorf*, même avec de fortes dilutions de ces sérums. D'autre part, les *Salmonella* mentionnés n'agglutinaient pas avec les sérums anti-dysenterie. Cependant, les fractions antigéniques (polysaccharido-lipidique selon Boivin et Mesrobian, acides selon Zinser et Parker, alcalines selon Pflueger dans la modification de Mikulaszek) isolées d'une souche de *Salmonella suipestifer* var. *kunzendorf* montraient une réaction nette de fixation de complément avec le sérum anti-*S. flexneri* type 2 a.

Les résultats des réactions d'agglutination et de fixation du complément sont indiqués dans les tableaux IV et V.

Au cours de nos recherches sur le groupe des bacilles de la dysenterie, nous avons rencontré assez souvent, avec Kurylowicz [2 b], des souches d'*Escherichia coli* agglutinant avec les sérums anti-*Shigella* spécifiques d'espèce et même de type.

Des recherches plus poussées ont donné des résultats extrêmement intéressants permettant d'éclaircir le problème de la parenté antigénique des bacilles intestinaux.

Sur 10 souches examinées, correspondant morphologiquement et biochimiquement aux bacilles *coli* typiques, nous avons constaté dans deux souches la présence de l'antigène d'espèce *S. shigae*, dans quatre souches la présence de l'antigène de type *S. flexneri* type 1 a, 3, dans une souche la présence de l'antigène typique de *S. castellanii* 4 (*S. madampensis*) et dans une souche la présence de l'antigène typique de *S. castellanii* 3 (*S. ceylonnensis* B, *S. dispar* II).

L'examen des fractions antigéniques, isolées aussi bien des *Shigella* que des *Escherichia* montrant une parenté réciproque, a prouvé que ce sont les fractions polysaccharidiques qui sont l'élément antigénique commun conditionnant cette parenté.

Nous avons été frappés par le fait que les souches *Escherichia*

montrant une parenté avec les bacilles *S. shigae* et *S. flexneri* (type 1a et 3) étaient lysées par le bactériophage polyvalent de la dysenterie à *S. shigae* et *S. flexneri*, alors que les souches *Escherichia* de contrôle n'ayant pas de parenté antigénique étaient insensibles à l'action du bactériophage de la dysenterie.

TABLEAU IV.

Souche	S E R U M		
	Salmonella paratyphi C	Salmonella suipestifer var. kunzendorf.	S. flexneri (pol.)
Salmonella H	8000 *	32 000	0
paratyphi C O	400	400	0
Salmonella H	8000	48 000	0
suipestifer var. kunzendorf. O	800	1 600	0
S. flexneri 1a	400	800	1600
2a	400	800	3200
3	0	0	3200

* Les chiffres indiquent la dilution des sérums examinés donnant une réaction nette d'agglutination.

TABLEAU V.

Fractions antigéniques Salmonella suipestifer var. kunzendorf.	S E R U M		
	Salm. suipestifer var. kunzendorf	S. flexneri 2a	S. flexneri 3
Polysaccharido- lipidique	250 000 *	32 000	0
Alcaline	500 000	64 000	0
Acide I	250 000	18 000	0
Acide II	1 000 000	64 000	0

* Les chiffres indiquent la dilution des fractions antigéniques donnant une forte réaction de fixation du complément avec les sérums dilués au 1/10.

A part cette parenté avec les *Shigella*, les souches d'*Escherichia* examinées présentaient en même temps une parenté avec certaines *Salmonella* (surtout *S. typhi*, *S. paratyphi* C).

Ces recherches indiquent que les germes appartenant aux *Enterobacteriaceae* présentent, du point de vue de leurs structure antigénique, une mosaïque composée d'une certaine quantité d'éléments dont le groupement varie, avec les espèces et les

types particuliers des *Enterobacteriaceae*. Pour certaines espèces, ces éléments peuvent jouer le rôle d'antigène de type (par exemple dans le cas de *S. flexneri* 1 a ou 3), pour d'autres (par exemple *Escherichia* ou *Salmonella*) ils ont seulement le caractère d'antigène de groupe. Les antigènes communs ont en général les caractères d'antigènes polysaccharidiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EWING (W. H.). *J. Immunol.*, 1954, **74**, 404.
- [2 a] KURYLOWICZ (W.) et SLOPEK (S.). *Med. Dosw. i Spol.*, 1946, **25**, 112 ; b) *id.*, 1947, **25**, 229.
- [3 a] KURYLOWICZ (W.) et SLOPEK (S.). *Przegląd Lekarski*, 1947, **23** ; b) *id.*, 1947, 427.
- [4] METZGER (M.). *Med. Dosw. i Spol.*, 1955, 85.
- [5] METZGER (M.), RUDNICKA (I.) et SLOPEK (S.). *Bull. Acad. Polon. Sci.* (*sous presse*).
- [6] Recommendations of the *Shigella* Commission (*Enterobacteriaceae* Sub-Committee) on the Nomenclature and Classification of the Dysentery Bacilli. *Internat. Bull. bacteriol. Nomenclature and Taxonomy*, 1954, **4**, n° 1.
- [7 a] SLOPEK (S.). *Przegląd Lekarski*, 1946, 427 ; b) *id.*, 1947, 202 ; c) *id.*, *Post. Hig. Med. Dosw.*, 1951, **4**, 80.

ÉTUDE IMMUNO-CHIMIQUE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE *SALMONELLA*, EN PARTICULIER *S. TYPHI*.

par E. MIKULASZEK

(Service de Microbiologie médicale
de l'Ecole de Médecine de Varsovie)

I. — L'ANTIGÈNE SOMATIQUE.

Voici la composition quantitative des facteurs endotoxiques de *S. typhi* déterminée par notre méthode [1].

Fraction polysaccharide, précipitée par l'alcool à 66 p. 100.	36,3 p. 100
Fraction polysaccharide, précipitée par l'alcool à 85 p. 100.	22,2 p. 100
Polysaccharides (totaux)	58,5 p. 100
Protéines précipitées au point iso-électrique	4,3 p. 100
Protéines précipitées par l'acide trichloracétique	6,1 p. 100
Résidu non déterminé	28,9 p. 100

Les tableaux I, II et III montrent le résultat de l'analyse chromatographique des polysaccharides fractionnés par l'alcool.

Pour déterminer les relations quantitatives des systèmes polysaccharidiques précipités, nous avons élaboré une méthode [3] fondée sur une estimation des protéines d'après la technique indiquée par Folin-Ciocalten et sur l'évaluation des glucides selon la méthode de l' α -naphthol indiquée par Dische et modifiée par Kabat-Meyer. Cette méthode permet de mesurer quantitativement les glucides dans le précipité, dérivés de l'antigène utilisé et des γ -globulines du sérum précipitant. Nous pourrions ainsi déterminer le pourcentage des glucides que contient le précipité, par rapport à la quantité de glucides ajoutée. Le point d'équivalence et les zones d'excédent d'antigène ou d'anticorps se laissent déterminer exactement par cette technique ; elle permet également de juger de l'homogénéité des antigènes employés et de la symétrie de la courbe de précipitation. Le pourcentage des glucides reconnus comme mannose varie d'après la nature de l'antigène. Dans la zone d'excédent d'antigène, le pourcentage des glucides peut atteindre 63,5.

Dans le cas de *S. typhi*, les polysaccharides, obtenus par des méthodes chimiques à partir de précipités spécifiques, sont sérologiquement actifs, et on peut s'en servir à nouveau comme antigène pour la réaction de précipitation. On peut, en effet, se servir avantageusement de cette méthode pour rechercher les caractères immunologiques des polysaccharides sérologiquement actifs.

TABLEAUX I ET II

SOUCHE 16.447 DE *Salmonella typhosa* (AVEC ÉQUIPEMENT ANTIGÉNIQUE COMPLET)

FRACTION	% DE LA FRACTION ALCOOL	% DES POLYSACC. TOTAUX	GLUCOS-AMINE	GLUCOSE ET/OU GALACTOSE	MANNOSE	XYLOSE ET/OU RIBOSE	RHAMNOSE	ACIDE URONIQUE	GLUCIDES NON IDENTIFIÉS	D OPT PRÉCIPIT 20 mn
a	32,0	14,8	+	++		+	±	±		342
b	45,5	1,5	±	++		+		±		550
c	51,1	4,8	±	++		+		+		340
d	55,5	10,9	±	++		+		+	+	250
e	59,5	8,2	±	++		++		+		215
f	62,1	3,1	+	++	±	+		+	±	705
g	66,6	11,0	+	++	+	++	+	+	+	025
h	74,7	7,3	±	++	+	+	+	±	±	300
i	80,1	7,4	±	++	±	±	+			010
j	87,5	4,9	±	++	+	+	+	+	±	066
k	91,6	1,3	±	++	+	++	+	+	±	340

SOUCHE 0.901 DE *Salmonella typhosa* (DÉPOURVUE D'ANTIGÈNE V_i)

FRACTION	% DE LA FRACTION ALCOOL	% DES POLYSACC. TOTAUX	GLUCOS-AMINE	GLUCOSE ET/OU GALACTOSE	MANNOSE	XYLOSE ET/OU RIBOSE	RHAMNOSE	ACIDE URONIQUE	GLUCIDES NON IDENTIFIÉS	D OPT PRÉCIPIT 20 mn
a	26,2	1,3	+	++		±		±		010
b	45,8	24,3	+	++		+		+		080
c	51,0	16,5	+	++		+		+		065
d	53,1	11,6	+	++		++		+		000
e	57,9	11,4	+	++		++		+		095
f	66,2	7,6	+	++	+	+	+	±	±	635
g	68,0	1,1	+	++	+	+	+	±	+	510
h	74,1	4,2	+	++	±	±	±	±	+	255
i	80,1	4,7	+	++		±	±		±	081

TABLEAU III - SOUCHE H.901 DE *S. typhosa* (DÉPOURVUE D'ANTIGÈNE)

FRACTION	% DE LA FRACTION ALCOOL	% DES POLYSACC. TOTAUX	GLUCOS-AMINE	GLUCOSE ET/OU GALACTOSE	MANNOSE	XYLOSE ET/OU RIBOSE	RHAMNOSE	ACIDE URONIQUE	GLUCIDES NON IDENTIFIÉS	D OPT PRÉCIPIT 20 mn
a	36,5	6,1		++		+		+		005
b	48,4	18,4	±	++		+		+		040
c	50,0	1,8	±	++		+		+		038
d	53,5	7,7	±	++		+		++		004
e	59,2	9,2	+	++		++		±	±	031
f	61,0	0,8	+	++	±	++	+	+	+	182
g	69,2	14,5	+	++	+	+	+	+	+	270
h	76,4	14,5	+	++	+	+	+	+	+	127
i	80,9	4,6	±	++		+		+		015

On peut, par cette même méthode, distinguer sérologiquement l'antigène somatique de l'antigène Vi et montrer son incapacité de servir de substratum aux phages Vi spécifiques. Les antigènes somatiques se trouvant en phase W ne réagissent pas, en effet, avec les phages Vi spécifiques [4, 5]. Les polysaccharides dérivés des facteurs endotoxiques de cultures en phase V sont impropres

à servir de substratum aux phages, bien que sérologiquement actifs (précipitation, fixation du complément, hémagglutination).

Après dissociation des cultures en types S et R, l'hydrolyse acide des facteurs endotoxiques montre une différence nette entre les deux types en ce qui concerne le nombre et la composition des glucides qu'ils contiennent. Le tableau IV résume ces différences.

TABLEAU IV

POLYSACCHARIDE DE LA SOUCHE		GLUCOS- AMINE	GLUCOSE ET/OU GALACTOSE	MANNOSE	XYLOSE ET/OU RIBOSE	RHAMNOSE	ACIDE URONIQUE	SUCRE MÉTHYLE NON IDENTIFIÉ RAPIDE	NOMBRE DE POLYSACCH EPROUVÉS
<i>S. typhosa</i> S	S	+	++	+	+	+	+	5	17
<i>S. typhosa</i> R	R	±	++		+		+		3
<i>S. enteritidis</i> S	S	+	++	+	+	+	+	2	4
<i>S. enteritidis</i> R	R	±	++		+		+		2
<i>S. pullorum</i> S	S	+	++	+	+	+	+		4
<i>S. pullorum</i> R	R	±	++		+		+		2
<i>S. paratyphi</i> AS	AS		++	+	+	+	+		2
<i>S. paratyphi</i> AR	AR		++		+		+		3

Chez le lapin, les antigènes somatiques de *S. typhi* provoquent une élévation de température quand on les injecte à la dose de 0,05 g/kg. Même en répétant ces injections (jusqu'à douze fois toutes les vingt-quatre heures) on voit la réponse thermique rester la même après chaque injection. On peut en déduire que l'organisme du lapin ne développe aucune résistance aux injections répétées d'antigène somatique [6].

La réaction de fixation du complément, faite avec des fractions nucléoprotéiques de *S. typhi*, semble montrer que dans la cellule microbienne polysaccharides et acides nucléiques sont liés de façon à former un complexe polysaccharide-acide nucléique-protéine-phosphatide, possédant la spécificité de l'antigène somatique [7].

II. — L'ANTIGÈNE DE SURFACE Vi.

Nous avons élaboré une méthode pour isoler l'antigène Vi [9, 10]. Au cours de la préparation, la purification de l'antigène était contrôlée étape par étape au moyen de quatre réactions biologiques : précipitation spécifique, hémagglutination passive, inhibition active vis-à-vis de phages spécifiques et blocage de la réaction d'hémagglutination par les virus oreillons NDV et grippal PR8 et Lee. L'analyse chromatographique des hydrates de carbone contenus dans l'antigène Vi a mis en évidence des différences significatives avec l'antigène somatique O : l'antigène Vi contient du galactose, du glucose et du ribose, alors que l'antigène O contient du glucose, du galactose, du mannose et du rhamnose.

L'hydrolyse acide montre que les deux antigènes possèdent deux composants que la chromatographie permet d'identifier comme étant la glucosamine et l'acide uronique. L'antigène Vi le mieux purifié jusqu'ici sensibilisait à l'hémo-agglutination à la dose de 0,012 g.

Le tableau V montre l'influence exercée sur nos préparations Vi par l'hydrolyse acide et alcaline.

TABLEAU V.-HYDROLYSE DE L'ANTIGÈNE VI PAR HCl 0,5 N ET NaOH 0,5 N

DURÉE DE L'HYDROLYSE À 75°	VISCOSITÉ RELATIVE	GLUCIDES EN µg	GROUPES-NH ₂ EN µg	TITRE DE L'HÉMAAGGL (hématies sensibilisées)	PRÉCIPITATION PAR LE SÉRUM ANTI-Vi	
					PROTÉINES EN mg	GLUCIDES (MANNOSE) EN mg
HCl 0,5 N						
0 mn	1,26	4	81	1/256	0,585	0,025
10 mn	1,08	137	108	1/512	0,510	0,022
30 mn	1,09	215	120	1/256	0,427	0,016
60 mn	1,05	269	90	0	0,315	0,012
3 h	1,05	362	74	0	0,150	0,007
6 h	1,03	410	70	0	0,079	0,002
NaOH 0,5 N						
0 mn	1,26	8	66	1/256	0,570	0,019
10 mn	1,15	15	63	0	0,008	0,002
Antigène Vi non hydrolysé						
	1,22	7	67,5	1/1024	0,559	0,027
Hydrolyse HCl 2 N 6 h						
	1,00	2379	—	0	0,000	0,000

Par fractionnement alcoolique ou acétonique, nous avons réussi à localiser l'activité biologique dans un petit nombre seulement des fractions obtenues. L'électrophorèse de la préparation purifiée ne donne qu'un seul sommet, ce qui prouve son homogénéité. La précipitation diffuse en gel de gélose montre une seule zone de précipitation pour la préparation la mieux purifiée.

L'adsorption à la surface de globules rouges fait disparaître complètement l'activité biologique qui caractérise l'antigène Vi, mais laisse les composants polysaccharides intacts [4, 5]. Ni l'oxydation par l'ion periodate, ni le chauffage à 120° ne détruisent l'activité biologique des préparations Vi purifiées [10, 11].

Nous avons imaginé un certain nombre de procédés pour la préparation de l'antigène Vi et pour mesurer son activité biologique. Nous avons pu ainsi constater que des préparations riches en glucides ou en protéines, pauvres en glucides ou même des lipides solubles dans l'alcool méthylique, présentaient toutes le même ensemble d'activités biologiques.

Nous avons étudié le mécanisme d'adsorption à la surface d'érythrocytes, ainsi que la possibilité de purification, par élution de globules rouges [11, 13]. Le phénomène d'adsorption en surface exige la présence d'électrolytes. Les groupes récepteurs se trouvant à la surface des globules rouges, et qui sont responsables de l'adsorption de l'antigène Vi, ne sont pas influencés par

le formol ou le periodate, et ne sont pas identiques aux récepteurs des virus [10, 11].

Un certain nombre de protéines, notamment l'albumine sérique, inhibent l'adsorption de l'antigène Vi à la surface des érythrocytes.

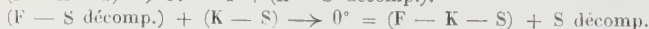
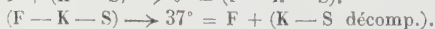
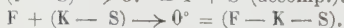
La méthode la plus efficace de purification de l'antigène Vi est l'élution à partir de globules rouges, suivie de chromatographie sur papier [13].

Les préparations Vi purifiées ont une tendance marquée à former des complexes avec les lipoides.

Nous avons pu établir [10, 11, 13] que les préparations Vi purifiées agissent comme substratum spécifique aux bactériophages. Nous avons montré que l'antigène Vi, adsorbé sur érythrocytes, se combine avec les bactériophages homologues; cette combinaison est inhibée par un sérum spécifique anti-Vi. La combinaison se montre réversible par élution des globules à une température convenable. Nous avons pu utiliser ce fait pour obtenir et purifier des bactériophages.

Des érythrocytes sensibilisés par une préparation Vi forment, en présence de bactériophage, un complexe [K-S-F] (1) qui se dissocie à 37°, le bactériophage étant alors libéré. Des érythrocytes ainsi traités ne peuvent plus adsorber le phage quand ils sont mis par la suite à 0°. Quand le complexe en question est tenu d'emblée à 0°, il y a également libération de phages, mais celle-ci a lieu avec une lenteur extrême. Cela semble montrer la nature enzymatique du processus.

Quand des préparations Vi sont mises en solution, elles n'ont aucune activité inhibitrice: cela est dû à la décomposition rapide du substratum des phages dans le complexe (F-S) rendant impossible l'isolement de cet intermédiaire. En mélangeant à 0° le complexe (F-S) avec des globules rouges sensibilisés, nous n'avons pu constater aucune adsorption de phages à la surface des érythrocytes. Par contre, quand on chauffe le complexe (F-S) à 37° et qu'on y ajoute des érythrocytes sensibilisés (K-S), une adsorption a lieu des phages libérés du complexe (F-S). Il est probable que les réactions se déroulent selon le schéma suivant:



Le fait que l'antigène Vi en solution n'agit pas comme substratum pour les phages trouve son analogie dans les substratums pour les virus. Il est intéressant de noter que la perte de l'activité

(1) K: globules rouges; F: phage; S: substratum.

vis-à-vis des phages ne modifie en rien l'activité sérologique (précipitation et hémagglutination passive). On pourrait interpréter ce phénomène en disant que seul un petit groupe « prosthétique » de la volumineuse molécule de l'antigène Vi agit comme substratum pour les phages.

Des expériences ultérieures [41, 43] ont permis de calculer les constantes d'adsorption et le déroulement de ces réactions. L'activité enzymatique du bactériophage est inhibée sous l'influence d'anticorps antiphages et également de sérums donnant des réactions croisées. D'autre part, nous avons pu constater que des phages inactivés par des rayons U. V. gardent leur activité enzymatique. On peut précipiter l'enzyme avec de l'alcool à basse température, on entraîne l'enzyme avec une solution concentrée de sulfate d'ammonium, sans que l'activité décomposante vis-à-vis de l'antigène Vi en soit diminuée.

Nous avons enfin élaboré une méthode d'hémagglutination phagique passive et avons calculé le nombre minimum de phages susceptible de former un treillis avec des globules rouges. Ce nombre est de 6-7.

L'enzyme-phage est thermolabile.

Il existe un parallélisme entre l'inactivation de l'enzyme-phage et la vitalité du phage. Nos recherches ont permis de localiser l'enzyme-phage au bout de la queue du phage et elles ont montré que les anticorps ne peuvent atteindre l'enzyme quand le phage a été adsorbé à la surface du corps microbien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIKULASZEK (E.), RZUCIDLO (L.) et WALECKI (H.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1950, **3**, 323.
- [2] DZULYNSKA (J.) et MIKULASZEK (E.). *Acta Biochem. Polon.*, 1954, **4**, 191.
- [3] MIKULASZEK (E.). *Acta Biochem. Polon.*, 1954, **4**, 163.
- [4] KOZINSKI (A. W.) et SLONIM (D.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1952, **4**, 1952, 217.
- [5] KOZINSKI (A. W.), MIKULASZEK (E.) et SLAVIK (K.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1952, **4**, 19.
- [6] MIKULASZEK (E.), KOPACKA (B.) et DYNER (E.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1952, **4**, 417.
- [7] MIKULASZEK (E.) et WALECKI (H.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1949, **3**.
- [8] KOZINSKI (A. W.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1951, **1**, 83.
- [9] KOZINSKI (A. W.) et MACIEREWICZ (M.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1951, **3**, 255.
- [10] KOZINSKI (A. W.), MACIEREWICZ (M.), MIKULASZEK (E.) et OPARA (Z.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1954, **6**, 161.
- [41] KOZINSKI (A. W.) et OPARA (Z.). *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1954, **2**, 169.
- [42] DZULYNSKA (J.) et MIKULASZEK (E.). (Sous presse.)
- [43] KOZINSKI (A. W.) et OPARA (Z.). (Sous presse.)

LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DE STAPHYLOCOQUES DE DIVERSES PROVENANCES RÔLE DE L'HÔPITAL DANS LA DISSÉMINATION DE SOUCHES RÉSISTANTES

par R. PAKULA.

Depuis quelques années, le nombre croissant d'infections causées par des staphylocoques résistants aux antibiotiques est devenu un problème sérieux, en Pologne comme ailleurs. Ainsi, en 1952, avons-nous décrit une septicémie grave due à une souche de staphylocoques résistante à la pénicilline, qui s'était produite dans une maternité de Varsovie. Ces temps derniers, le nombre d'infections graves causées par des staphylocoques résistants à la pénicilline ou d'autres antibiotiques va en augmentant, surtout parmi les nourrissons. Nous avons donc été amené à entreprendre l'étude de la sensibilité aux antibiotiques d'un certain nombre de souches de diverses provenances : malades ou porteurs de germes. Plusieurs auteurs ont déjà attiré l'attention sur le rôle de l'hôpital dans la dissémination des staphylocoques résistants aux antibiotiques (Barber et Dovzhenko, 1949 ; Rountree et Thomson, 1949 ; Barber et coll., 1953 ; Clark et coll., 1952). Nous avons, à notre tour, entrepris l'étude de souches de staphylocoques, isolées de sujets se trouvant en traitement à l'hôpital pour d'autres maladies. Des malades hébergeant des staphylocoques pathogènes en puissance étaient considérés comme porteurs de germes. Seules les souches coagulase-phosphatase positives ont été prises en considération. Conformément aux recherches de Barber et Kubar (1951) et aux nôtres, nous prenons la capacité d'un staphylocoque de produire rapidement de la phosphatase pour un signe de pathogénité en puissance. Chez au moins 95 p. 100 des souches de ce germe, il existe une corrélation entre la capacité de produire de la coagulase et celle de former de la phosphatase.

La différenciation des souches isolées eut lieu d'après leur sensibilité aux différents types de phages. Cela nous a permis certaines conclusions en ce qui concerne le genre de modifications qu'avaient subies les staphylocoques, notamment ceux qui provenaient de porteurs de germes en milieu hospitalier.

Les phages utilisés provenaient du Central Public Health Laboratory de Colindale (Londres).

Nous nous sommes servi de milieux de culture liquides pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, utilisant quatre concentrations de chaque antibiotique.

Les souches de staphylocoques furent divisées en quatre groupes d'après leur provenance.

Celles du premier groupe avaient été isolées de 21 nourrissons hospitalisés, âgés de 3 semaines à 7 mois, dont 12 étaient atteints de pneumonie staphylococcique ou de septicémie. Ces 12 souches furent isolées du sang ou du pus pleural. Pour les autres enfants les souches provenaient de suppurations cutanées, oculaires ou auriculaires.

Le deuxième groupe comprend 138 souches isolées de 138 ouvriers mineurs atteints de suppurations cutanées, en traitement ambulatoire.

Les souches du troisième groupe avaient été isolées à partir de sécrétions nasales ou pharyngées chez 32 malades atteints de typhus ou de fièvre typhoïde. Les prélèvements avaient été faits chez ces malades à leur entrée, durant leur séjour et à leur sortie de l'hôpital. Tous ont été traités par le chloramphénicol, deux en plus par la pénicilline et trois par l'auroéomycine.

Le quatrième groupe comprend des souches isolées chez 66 femmes se trouvant dans des maternités, à partir de mucus nasal, pharyngé et vaginal. Les prélèvements furent effectués à leur entrée et à leur sortie.

Enfin un certain nombre de souches furent obtenues à partir de pustules cutanées, ou de suppurations oculaires ou ombilicales, chez 10 à 20 nourrissons nés des femmes sus-mentionnées.

Les deux derniers groupes comprennent encore quelques souches provenant de membres du personnel hospitalier.

RÉSULTATS.

Le tableau I montre la sensibilité à 4 antibiotiques des staphylocoques isolés de 21 nourrissons (groupe 1) et la sensibilité à la pénicilline des souches provenant des 138 mineurs (groupe 2).

A une exception près, toutes les souches provenant des nourrissons se montrent résistantes à la pénicilline, et certaines d'entre elles résistent à 4 antibiotiques.

Parmi celles provenant des mineurs, 12 p. 100 seulement sont pénicillino-résistantes.

Le tableau II donne les résultats obtenus avec les souches provenant de 32 malades atteints de typhus ou de typhoïde quant à leur sensibilité à la pénicilline et au chloramphénicol.

On voit que parmi les 32 malades, 9 entrèrent à l'hôpital

porteurs de staphylocoques pénicillino-résistants, et 3 avaient des staphylocoques résistants au chloramphénicol. A la sortie de l'hôpital, on trouva des staphylocoques résistants à la pénicilline chez 29 d'entre eux, dont 28 avaient des staphylocoques résistants à la pénicilline et au chloramphénicol. Cette dernière forme de

TABLEAU I

ANTIBIOTIQUE	GROUPE I		GROUPE II	
	SENSIBLE	RÉSISTANT	SENSIBLE	RÉSISTANT
Pénicilline	1	24	121 (88%)	17 (12%)
Streptomycine	17	8	non éprouvé	non éprouvé
Auréomycine	19	6	"	"
Chloramphénicol	15	10	"	"

TABLEAU II

ENTRÉE				SORTIE			
Nombre de personnes				Nombre de personnes			
32				32			
Nombre de porteurs de staphyloc.				Nombre de porteurs de staphyloc.			
18				29			
Souches isolées				Souches isolées			
28				46			
Pénicilline		Chloramphénicol		Pénicilline		Chloramphénicol	
S	R	S	R	S	R	S	R
14	14	23	5	0	46	1	45
(9)	(9)	(15)	(3)	(29)	(28)	(1)	(28)

S = sensible R = résistant () = nombre de personnes

résistance ne peut être due qu'au traitement par le chloramphénicol qu'avaient subi ces malades, car aucune souche résistante à cet antibiotique ne fut isolée des membres du personnel hospitalier.

On trouvera au tableau III la sensibilité à la pénicilline et au chloramphénicol des staphylocoques isolés de ces membres.

Les femmes quittant les maternités ont donné, elles aussi, de nombreuses souches pénicillino-résistantes, comme le montre le tableau IV.

Parmi ces femmes, 3 étaient porteuses de staphylocoques pénicillino-résistants dès leur entrée en maternité, alors qu'à la sortie, 34 ont donné des cultures pénicillino-résistantes.

On a isolé des staphylocoques du mucus nasal chez 17 parmi 24 membres du personnel hospitalier, et toutes les souches ainsi obtenues étaient pénicillino-résistantes.

TABLEAU III

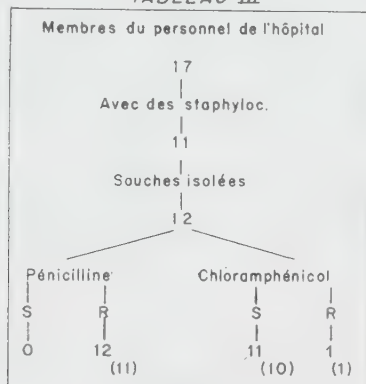


TABLEAU IV

ENTRÉE	SORTIE
<p>Nombre de personnes</p> <p>66</p> <p>Nombre de porteurs de staphyloc.</p> <p>8</p> <p>Souches</p> <p>9</p> <p>Pénicilline</p> <p>S R</p> <p>6 3</p> <p>(5) (3)</p>	<p>Nombre de personnes</p> <p>66</p> <p>Nombre de porteurs de staphyloc.</p> <p>44</p> <p>Souches</p> <p>58</p> <p>Pénicilline</p> <p>S R</p> <p>14 44</p> <p>(10) (34)</p>

Chez 14 parmi 66 nourrissons nés en maternité existaient des lésions cutanées, ombilicales ou oculaires d'origine staphylococcique. Toutes les souches isolées de ces lésions étaient pénicillino-résistantes sauf une.

Comme nous l'avons dit plus haut, toutes les souches de staphylocoques en puissance de pathogénicité furent examinées quant à leur sensibilité aux phages. Nous ne mentionnons que les résultats obtenus sous ce rapport avec les souches des groupes 3 et 4 en relation avec le changement de leur sensibilité aux antibiotiques.

On trouvera au tableau V quelques cas se rapportant à un groupe de malades se trouvant dans un hôpital pour maladies infectieuses.

TABLEAU V

P. CHL. FORMULE PHAGIQUE					P. CHL. FORMULE PHAGIQUE				
1	Entrée	R	S	NT	5	Entrée	S	S	3A-3B
	À l'hôpital	R	R	NT		À l'hôpital	S	R	NT
		R	R	NT			R	R	NT
	Sortie	R	R	NT		Sortie	R	R	3A
2	Entrée	R	S	NT	6	Entrée	S	R	NT
	À l'hôpital	R	R	NT		À l'hôpital	R	R	NT
		R	R	NT			R	R	NT
	Sortie	R	R	NT		Sortie	R	R	54
3	Entrée	R	S	52-52A-3A	7	Entrée	S	S	70-42D
	À l'hôpital	R	R	52-52A-3A		À l'hôpital	R	R	3A-3B-3C-55
		R	R	52-52A-3A			R	R	3A-3B-3C
	Sortie	R	R	52-52A-3A		Sortie	R	R	3A-3B-3C
4	Entrée	R	S	6-53	8	Entrée	S	S	6-75-77-47-29-52
	À l'hôpital	.	.	.		À l'hôpital	R	R	6-75-77-47
		.	.	.			R	R	NT
	Sortie	R	R	6-53		Sortie	R	R	3A-3B-3C

S=sensible R=résistant NT=non typable **non examiné

TABLEAU VI

	PÉNICILLINE	FORMULE PHAGIQUE
1. Entrée	R	3B
Sortie	R	75-52a-44-42D
2. Entrée	R	52A-52-73-42E
Sortie	R	52A-52
3. Entrée	S	3B
Sortie	R	6-75-77
4. Entrée	S	NT
Sortie	S	NT
5. Entrée	R	29
Sortie	R	77-54-52A
6. Entrée	S	6-54-70-42D
Sortie	R	75-54-77

On y voit à gauche 4 exemples d'une modification du degré de résistances au chloramphénicol sans changement de la sensibilité aux phages. Il est très probable qu'au moins 2 des 4 malades (cas 3 et 4 du tableau V) ont quitté l'hôpital porteurs des mêmes staphylocoques qu'ils avaient déjà à l'entrée.

Les 4 cas représentés au côté gauche de ce tableau sont en effet les seuls pour lesquels on peut supposer qu'ils avaient gardé les mêmes staphylocoques du début à la fin de leur séjour à l'hôpital. Chez tous les autres, il fut établi que les staphylocoques avaient été modifiés durant ce séjour (côté droit du tableau). Cette modification était manifeste, que les germes fussent ou non résistants aux antibiotiques à l'entrée.

Chez les femmes également, nous avons pu constater que les staphylocoques qu'elles hébergeaient dans leur nasopharynx avaient été remplacés par d'autres durant leur séjour en maternité. Il y en eut parmi elles, en effet, six qui ont donné des cultures de staphylocoques à l'entrée et à la sortie de la maternité. Chez toutes les six, les souches isolées à l'entrée n'avaient pas la même sensibilité aux phages que celles isolées à la sortie (voir le tableau VI).

DISCUSSION.

Les résultats obtenus par nous, comme ceux d'autres auteurs, ne laissent aucun doute sur le rôle des hôpitaux dans la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques.

Ainsi, des souches de staphylocoques pénicillino-résistantes furent isolées chez 9 seulement parmi 32 malades à l'entrée à l'hôpital pour maladies infectieuses, et parmi ces 9 souches, 3 étaient également résistantes au chloramphénicol. Par contre, à leur sortie de l'hôpital, des souches pénicillino-résistantes furent isolées de 29 de ces malades, dont 28 se montraient également résistantes au chloramphénicol. On a vu le même phénomène se produire chez des femmes qui n'avaient séjourné que dix jours à la maternité. Parmi les 66 femmes, 3 seulement étaient à leur entrée à la maternité porteuses de staphylocoques pénicillino-résistants. A la sortie, 36 d'entre elles en hébergeaient.

Il semble hors de doute que le pourcentage élevé des sujets contaminés à l'hôpital par des staphylocoques résistants aux antibiotiques soit en relation avec le pourcentage également élevé de porteurs de staphylocoques résistants se trouvant parmi les membres du personnel hospitalier. En effet, toutes les souches isolées du personnel étaient pénicillino-résistantes, et le nombre de porteurs de ces germes atteignait environ 60 p. 100 parmi eux. Le même pourcentage de porteurs se trouvait parmi le personnel des maternités. Cela explique le nombre très élevé d'infections à staphylocoques parmi les nourrissons nés dans ces maternités et le pourcentage également élevé de souches pénicillino-résistantes trouvées chez ces nourrissons.

Barber et ses coll. ont trouvé que 65 p. 100 des nourrissons nés dans une maternité de Londres étaient porteurs de staphylocoques pénicillino-résistants. Il faut insister sur le fait que presque

toutes les infections graves à staphylocoques chez les nourrissons (septicémie, pneumonie, abcès pulmonaire) sont dues à des germes résistants à la pénicilline et souvent à d'autres antibiotiques. Dans le cas des nourrissons examinés par nous, au nombre de 21, dont 10 avaient moins de 3 mois, il fut démontré que leur infection datait de leur séjour à l'hôpital ou en maternité. Plusieurs de ces enfants n'ont jamais pu être ramenés chez eux. D'autres portaient sur la peau des cicatrices d'anciennes infections staphylococciques. On peut donc considérer les maternités et les hôpitaux comme sources principales de ces infections graves.

Il est extrêmement important de faire ressortir, sous ce rapport, la différence frappante existant entre personnes se trouvant à un titre quelconque en milieu hospitalier, et personnes ne s'y trouvant pas, en ce qui concerne le pourcentage des souches résistantes qu'on trouve chez elles. Nous ne citons comme exemple que les mineurs en traitement ambulatoire, dont 12 p. 100 seulement avaient des staphylocoques résistants, et le personnel de l'hôpital pour maladies infectieuses, dont tous les membres étaient porteurs de germes résistants.

Nos résultats concordent parfaitement avec ceux de Fuville et coll. (1954), qui ont trouvé des souches pénicillino-résistantes dans le nasopharynx de 17,8 p. 100 des donneurs de sang examinés par eux, 60 p. 100 du personnel hospitalier, 80,5 p. 100 des malades atteints d'infections staphylococciques hospitalisés, et 32,4 p. 100 de ces mêmes infections en traitement ambulatoire.

Les faits que nous venons d'exposer semblent confirmer l'opinion d'Oswald et coll. qui estiment que la proportion de souches pénicillino-résistantes qu'on rencontre parmi la population dans son ensemble depuis dix ans est peu de chose, comparée à celle qu'on relève dans les hôpitaux. Cela n'empêche qu'à l'avenir une situation comparable à celle qui règne dans les hôpitaux pourra très bien se produire parmi la population générale, si l'on utilise les antibiotiques à tour de bras.

Comme nous l'avons déjà fait remarquer plus haut, la grande majorité des souches isolées des malades durant leur séjour à l'hôpital ou à la sortie ne se comportent pas, vis-à-vis du bactériophage, de la même façon que les souches isolées à l'entrée. Il en va de même pour les souches isolées à la maternité.

On n'a jamais constaté, jusqu'ici, de modification de ce comportement *in vitro*, et il est peu probable qu'un tel changement puisse avoir lieu *in vivo*. On peut donc admettre que les modifications de sensibilité vis-à-vis des phages, constatées pour les souches isolées de malades hospitalisés, sont un signe du remplacement des staphylocoques dont ils étaient porteurs à leur entrée, par d'autres staphylocoques durant leur séjour en clinique.

Metzger et coll. (1953) ont, eux aussi, constaté ce phénomène de remplacement de germes sensibles par des germes résistants aux antibiotiques chez des malades hospitalisés, et ils en décrivent un exemple (remplacement d'un staphylocoque sensible à l'érythromycine par un staphylocoque résistant à cet antibiotique chez un malade atteint d'un abcès pleural ; ce dernier germe n'avait pas la même sensibilité aux phages que le premier, ce qui est un argument en faveur du remplacement d'un germe par un autre). Ces auteurs voient dans leurs observations une confirmation de la théorie de sélection plutôt que de l'action présumée directe des antibiotiques sur les germes.

Il nous semble que ni leurs expériences ni les nôtres n'autorisent pour le moment une conclusion de cette importance en ce qui concerne le mécanisme d'action des antibiotiques.

Un fait cependant est certain : des staphylocoques sensibles peuvent être remplacés par des staphylocoques résistants d'origine différente, indépendamment du traitement antibiotique donné au malade. Nous l'avons démontré en isolant chez des femmes des staphylocoques sensibles à la pénicilline à leur entrée à la maternité et des staphylocoques résistants à leur sortie, sans que ces femmes eussent subi de traitement à la pénicilline. De tels changements sont fréquents aux hôpitaux. Nous n'en connaissons pas la cause, mais il est hors de doute que nous nous trouvons devant un problème sérieux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARBER (M.) et ROZWADOWSKA-DOWZENKO (M.). *Lancet*, 1948, **2**, 641.
- [2] BARBER (M.), WILSON (B. D. R.), RIPPON (J. E.) et WILLIAMS (R. E. O.). *J. Obstetr. Gynaecol.*, 1953, **60**, 476.
- [3] CLARKE (S. K. R.), DALGLEISH (P. G.) et GILLESPIE (W. A.). *Lancet*, 1952, **1**, 1132.
- [4] FUSILLO (M. H.), ROERIG (R. N.) et ERNST (K. F.). *Antib. and Chemother.*, 1953, **4**, 102.
- [5] METZGER (J. F.), FUSILLO (M. H.), ROERIG (R. N.) et ERNST (K. F.). *New England J. Med.*, 1954, **250**, 1030.
- [6] OSWALD (P. M.), THOMSON (E. F.), RANDALL (W. A.) et WELCH (H.). *Proc. Antibiot. Sympos. F. D. A.*, Washington D. C., 1953.
- [7] PAKULA (R.), ZAPASNIK-KOBIERSKA (M. H.) et RABCYNSKA (F.). *Pediatrica Polska*, 1953, **3**, 271.
- [8] ROUNTREE (P. M.) et THOMSON (E. F.). *Lancet*, 1949, **2**, 501.

UN FACTEUR SENSIBILISANT LES GLOBULES ROUGES, COMMUN AUX STAPHYLOCOQUES ET AUX STREPTOCOQUES HÉMOLYTIQUES

par R. PAKULA et W. WALCZAK.

Keogh, North et Warburton ont montré en 1947 que des polysaccharides, provenant de cultures S (smooth) d'*Haemophilus influenzae*, sont adsorbés à la surface de globules rouges, et que le sérum homologue agglutine ces cellules. De nombreuses autres espèces microbiennes ont été, depuis, examinées sous ce rapport, et on a constaté que non seulement les polysaccharides, mais encore les nucléoprotéines et d'autres substances d'origine microbienne, sont adsorbées à la surface des érythrocytes.

Il était donc à prévoir que les polysaccharides des streptocoques hémolytiques étaient, eux aussi, adsorbés par les globules rouges et que ces cellules seraient ensuite agglutinées par du sérum anti-streptococcique.

Si les recherches que nous avons entreprises à ce sujet il y a quelques années n'ont donné aucun résultat en ce qui concerne les polysaccharides C, elles nous ont permis cependant la découverte d'une autre substance sensibilisatrice des globules rouges, substance présente dans les streptocoques hémolytiques et les staphylocoques et de nature identique pour les deux. Nous nous proposons, dans les pages suivantes, de décrire quelques-unes des expériences qui ont amené cette découverte et de décrire quelques-unes des propriétés de cette substance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Au cours de nos recherches pour trouver une substance susceptible d'être adsorbée à la surface d'érythrocytes, nous nous sommes adressés à des fractions polysaccharides, obtenues par des moyens variés à partir de streptocoques hémolytiques des groupes sérologiques A-M (filtrats de cultures en milieux liquides ou extraits aqueux).

Par la suite, nous avons étendu nos recherches à des filtrats ou extraits de staphylocoques.

Les globules rouges, sensibilisés par ces préparations, étaient

soit hémolysés, soit agglutinés par des immunsérums, suivant les conditions expérimentales.

Des solutions de polysaccharides étaient préparées par trois méthodes : 1° extraction acide selon Lancefield ; 2° méthode au formamide de Fuller ; 3° la technique suivante :

Après centrifugation et lavage à l'eau physiologique, les germes furent introduits dans une solution concentrée non purifiée d'actinomycétine, provenant d'une culture de *Streptomyces albus* ou *griseus*. La suspension microbienne était placée dans un bain-marie à 50°. Quand la lyse microbienne était complète, on ajoutait 2,5 volumes d'alcool acide (95 parties d'alcool, 5 de HCl normal). Au liquide surnageant, séparé du dépôt formé par centrifugation, on ajoutait 5 vol. d'acétone. Le dépôt contenait des polysaccharides qui étaient dissous dans de l'eau physiologique et neutralisés par du bicarbonate de sodium.

Avant leur mise en contact avec des globules rouges, les filtrats de culture étaient neutralisés, filtrés sur filtre Berkefeld et chauffés trente minutes à 60° pour détruire les streptolysines.

Pour la préparation des extraits aqueux, nous utilisons des germes lavés trois fois. L'extraction durait dix minutes à 100°.

SENSIBILISATION DES GLOBULES ROUGES. — Aux préparations que nous venons de décrire furent ajoutés 2 p. 100 de globules rouges de poule, mouton, lapin ou d'homme (groupe O). Pour les réactions d'hémolyse nous utilisons des érythrocytes de mouton ou de lapin. Les suspensions des globules dans les préparations microbiennes étaient laissées une heure et demie à deux heures à la température du laboratoire ou à 37° et ensuite lavées trois fois à l'eau physiologique.

HÉMAGGLUTINATION ET HÉMOLYSE. — Pour les réactions d'hémagglutination, 0,5 ml d'une suspension à 0,25 p. 100 de globules rouges sensibilisés était introduit dans chacun d'une série de tubes, contenant 0,5 ml d'immunsérum dilué progressivement au 1/40-1/5 120. Pour l'hémolyse on introduisait 0,1 ml de complément dilué au 1/10 et 0,5 ml d'une suspension à 1 p. 100 de globules rouges sensibilisés dans une série de tubes contenant 0,5 ml des mêmes dilutions d'immunsérum.

Les immunsérums. — Les sérums de lapin antistreptococciques, obtenus par des injections intraveineuses de suspension de streptocoques hémolytiques, ne contiennent souvent aucun anticorps agglutinant les globules rouges sensibilisés par des filtrats ou extraits de streptocoques. Cependant, exceptionnellement, certains de ces sérums contiennent des agglutinines à un titre élevé.

Au début, c'était ce genre de sérum que nous utilisions pour nos expériences. Par la suite, nous avons obtenu des immu-

sérums en traitant des lapins par des injections intraveineuses de globules rouges sensibilisés de mouton. Ces derniers sérums étaient absorbés par des globules rouges non sensibilisés.

Nous avons également effectué des réactions d'héماغglutination avec des sérums provenant de personnes normales ou malades, dans le but d'établir l'existence éventuelle d'une relation entre le taux de streptolysine O et les anticorps vis-à-vis d'érythrocytes sensibilisés.

Témoins. — Nous avons complété nos expériences en mettant en contact des globules rouges sensibilisés ou non sensibilisés avec du sérum de lapin normal ou avec de l'eau physiologique. Pour l'hémolyse, les immunsérums étaient mis en contact avec des globules rouges normaux en présence de complément, et des globules sensibilisés avec de l'eau physiologique en présence de complément.

RÉSULTATS.

Le tableau I montre les résultats des réactions d'héماغglutination et d'hémolyse effectuées avec des globules rouges de mouton, sensibilisés par différentes préparations dérivées de streptocoques hémolytiques du groupe A.

TABLEAU I. - AGGLUTINATION ET HÉMOLYSE PASSIVES DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON SENSIBILISÉS DANS DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DE STREPTOCOQUES HÉMOLYTIQUES DU GROUPE A.

	HÉMAGGLUTINATION					HÉMOLYSE						
	DILUTION DU SÉRUM					DILUTION DU SÉRUM						
	80	160	320	640	1280	80	160	320	640	1280	2560	
EXTRAIT LANCEFIELD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FRACTION POLYSACCHARIDIQUE D'APRÈS FULLER	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	2	
FRACTION POLYSACCHARIDIQUE OBTENUE PAR LA MÉTHODE ENZYMATIQUE	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	
EXTRAIT EN H ₂ O À 100°C	3	3	3	2	1	3	3	3	3	3	1	
FILTRAT	3	3	3	2	0	3	3	3	3	3	1	

0 = pas d'agglutination, pas d'hémolyse

3 = agglutination intense, hémolyse complète

1 = légère agglutination, traces d'hémolyse

L'immunsérum utilisé pour ces expériences et les suivantes provenait de lapins traités par des érythrocytes de mouton, sensibilisés par contact avec la fraction polysaccharide. Cette fraction avait été préparée par la méthode enzymatique à partir de streptocoques hémolytiques du groupe C. Le sérum avait été débarrassé par absorption des anticorps vis-à-vis d'érythrocytes de mouton normaux.

Les expériences que nous venons de mentionner nous ont montré que toutes les préparations utilisées sensibilisent les globules

rouges à l'exception des extraits Lancefield. Or, ces derniers contiennent du polysaccharide C. Il est donc probable que la substance adsorbée à la surface des globules rouges ne soit pas le polysaccharide C. Un certain nombre de faits corroborent cette hypothèse. On sait que les polysaccharides C sont spécifiques pour plusieurs groupes sérologiques de streptocoques hémolytiques. Cependant, des globules rouges, sensibilisés par les préparations décrites plus haut (exception faite des extraits Lancefield) dérivées de streptocoques hémolytiques des groupes B, C, D, E, F, K, L et M, sont tous agglutinés ou lysés par le même sérum (celui qui fut utilisé pour les expériences que résume le tableau I), et il en va de même pour les globules rouges sensibilisés par les préparations dérivées de streptocoques du groupe A.

Cela prouve que, contrairement aux polysaccharides C, la substance adsorbée sur les globules rouges est commune à tous les groupes sérologiques de streptocoques hémolytiques de A jusqu'à M.

L'analyse des anticorps, présents dans les immunosérums anti-streptococciques, fait, elle aussi, ressortir des différences entre

TABLEAU II.—TENEUR EN PRÉCIPITINE ANTI-C ET EN AGGLUTININES POUR LES GLOBULES ROUGES SENSIBILISÉS DANS LES SÉRUMS ANTI-STREPTOCOCCIQUES DE LAPIN.

NOM DE LA SOUCHE	GROUPE SÉROLOGIQUE	DILUTION DE SÉRUM LA PLUS ÉLEVÉE AGGLUTINANT LES GLOBULES ROUGES	PRÉSENCE DE PRÉCIPITINES ANTI—C
SF 130	A	80	+
D 58		—	+
95/RB5		160	+
Wheatley		—	+
Matthews		1280	+
K 64/O/8	C	320	+
C4		—	+
GAUNT	G	40	+
F 68 A		—	+
PRICE		—	+

ces anticorps et les polysaccharides C. Le tableau II illustre ce fait.

Ce tableau montre que tous les sérums examinés contiennent la précipitine anti-C, alors que quelques-uns seulement d'entre eux contiennent des agglutinines vis-à-vis de globules rouges sensibilisés. Il s'ensuit que les polysaccharides C ne peuvent être identiques à la substance adsorbée sur les globules rouges.

La présence, dans tous les groupes sérologiques de streptocoques hémolytiques, d'une substance commune sensibilisant les globules rouges nous a incités à étendre nos recherches à d'autres cocci Gram-positifs, notamment aux pneumocoques, staphylocoques et *Str. viridans*.

Si nos recherches sur la présence d'une telle substance sont restées sans résultat pour le pneumocoque et *Str. viridans*, nous avons, par contre, réussi à mettre en évidence, chez les staphylocoques, une substance adsorbable sur les globules rouges identique à celle que nous avons trouvée chez les streptocoques hémolytiques.

Le tableau III résume les expériences d'agglutination d'érythrocytes du mouton, sensibilisés par des préparations dérivées de staphylocoques selon les mêmes procédés utilisés pour les streptocoques.

TABLEAU III.- AGGLUTINATION PASSIVE DE GLOBULES ROUGES DE MOUTON SENSIBILISÉS DANS DIVERSES PRÉPARATIONS DE STREPTOCOQUES

	HÉMAGGLUTINATION					HÉMOLYSE					
	DILUTION DU SÉRUM					DILUTION DU SÉRUM					
	80	160	320	640	1280	80	160	320	640	1280	2560
EXTRAIT LANCEFIELD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FRACTION POLYSACCHARIDIQUE D'APRÈS FULLER	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1
FRACTION POLYSACCHARIDIQUE OBTENUE PAR LA MÉTHODE ENZYMATIQUE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
EXTRAIT EN H ₂ O À 100°C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
FILTRAT	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	1

0 = pas d'agglutination, pas d'hémolyse

3 = agglutination intense, hémolyse complète

1 = légère agglutination, traces d'hémolyse

Comme pour les expériences du tableau I, nous avons employé du sérum de lapins traités par une suspension de globules rouges, sensibilisés dans une solution de polysaccharide provenant de streptocoques hémolytiques du groupe C. Les résultats sont les mêmes, qu'il s'agisse de staphylocoques coagulase-positifs ou négatifs.

Une comparaison des Tableaux I et III ne semble laisser aucun doute sur l'identité entre elles des substances sensibilisant les globules rouges des staphylocoques et des streptocoques hémolytiques.

Etant donné la fréquence, chez l'homme, des infections à staphylocoques et à streptocoques, il nous a paru intéressant de rechercher le taux des anticorps vis-à-vis de cet antigène dans le sérum humain et la relation entre ce taux et celui des autres anticorps suscités par les infections à streptocoques, par exemple le taux de l'antistreptolysine O.

Le tableau IV, qui représente les résultats obtenus avec 4 seulement parmi 200 sérums humains examinés, donne la réponse à cette question.

On voit que le taux des hémagglutinations est peu élevé dans

les sérums examinés, et qu'il n'existe aucune relation entre ce taux et l'antistreptolysine O.

Nous n'avons pas réussi à déterminer la structure chimique de la substance en question. Il nous a souvent été possible, par

TABLEAU IV.-TITRE DES AGGLUTININES POUR LES GLOBULES ROUGES SENSIBILISÉS COMPARÉ AU TITRE DE L'ANTISTREPTOLYSINE DANS LES SÉRUMS HUMAINS.

N ^o DU SÉRUM	DIAGNOSTIC	TITRE DE L'HÉMAGGLUTININE	TITRE DE L'ANTI-STREPTOLYSINE O
1	Rhumatisme aigu	128	450
2		32	580
3		64	875
4		128	1180
5	Scarlatine	64	350
6		128	400
7		64	250
8	Sujets Normaux	64	110
9		256	50
10		128	100

adsorption sur du charbon activé, d'éliminer les polysaccharides C des fractions polysaccharides, et nous avons obtenu ainsi des solutions qui sensibilisaient les globules rouges, mais nous n'avons pas réussi à mettre en évidence du polysaccharide C par des réactions de précipitation avec du sérum homologue. La quantité de substance ainsi obtenue était cependant trop insignifiante pour permettre son analyse chimique; d'autre part, nous ne pouvions pas savoir si dans ce précipité il ne se trouvait pas de résidu de polysaccharide C trop minime pour être décelé par la méthode de précipitation. Pourtant, certaines propriétés connues de la substance permettent de penser qu'il ne s'agit pas d'une protéine. En effet, elle résiste à un chauffage à 150° pendant quinze minutes sans perdre ses propriétés biologiques, les réactions propres aux protéines sont négatives, les propriétés biologiques restent intactes malgré un traitement par la pepsine, la trypsine et la ribonucléase; elle est soluble dans l'alcool acide à 70 p. 100.

La substance ne traverse pas les filtres en cellophane; elle est détruite par chauffage à 100° pendant 10 minutes dans l'acide chlorhydrique 0,2 N.

Cette dernière propriété explique pourquoi les extraits Lancefield ne sensibilisent pas les globules rouges, et elle est une preuve de plus que la substance adsorbée sur les globules rouges

est différente des polysaccharides C, car ceux-ci ne sont pas dépolymérisés par un acide aussi faible après dix minutes de chauffage à 100°.

DISCUSSION.

Kirby (1951) a pu, avec des sérums de malades atteints d'infections à streptocoques, agglutiner des globules rouges sensibilisés par des fractions polysaccharide obtenues par la méthode de Fuller, ou par des solutions concentrées mais non purifiées de streptolysine O. Il s'étonne de constater que des globules rouges, sensibilisés par différentes préparations, dont l'une était une solution relativement pure de polysaccharide et une autre une solution de protéine, sont agglutinés au même titre par les différents sérums examinés par lui. Kirby a probablement raison en supposant que dans les deux cas la substance adsorbée sur les globules rouges était la même. D'après lui, cependant, cette substance n'est autre que le polysaccharide se trouvant en quantité minime dans les préparations de streptolysine O. Nous pensons que cette opinion est erronée, car nous avons démontré que le polysaccharide C n'est pas adsorbé sur les globules rouges.

Harris et Harris (1953) ont sensibilisé des globules rouges en les mettant en contact avec des filtrats concentrés de cultures, et ils les ont utilisés pour la recherche d'anticorps dans des sérums de malades atteints de scarlatine ou de fièvre rhumatismale. Comme ce fut le cas pour Kirby, ils n'ont trouvé aucune relation entre le titre de ces anticorps et la nature streptococcique des infections. Les résultats obtenus par ces deux auteurs confirment les nôtres.

Deux ans après que nous eussions établi l'existence d'une substance adsorbable sur globules rouge commune aux staphylocoques et aux streptocoques, Fraser (1954) publia un mémoire dans lequel il arrivait à la même conclusion. Cet auteur utilisa pour ses recherches les mêmes préparations que nous, mais aboutit à sa conclusion d'une façon quelque peu différente de la nôtre. Il établit par trois fois que le sérum de malades atteints de fièvre ganglionnaire agglutine des globules rouges sensibilisés par des préparations dérivées de staphylocoques et de streptocoques.

Les expériences de Fraser ne permettent pas, évidemment, à cause de leur petit nombre, de tirer la moindre conclusion en ce qui concerne l'étiologie de la fièvre ganglionnaire.

On peut cependant tenir pour à peu près certain que la substance adsorbable sur globules rouges décrite par Fraser est identique à celle décrite par nous-mêmes.

Bien entendu, la découverte d'une seule substance, commune aux staphylocoques et aux streptocoques ne saurait permettre des

conclusions sur leur phylogénie. Il est cependant intéressant, sous ce rapport, d'attirer l'attention sur la découverte par Simpson (1953), d'une similarité antigénique entre les hémolysines de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRASER (K. B.). *J. Path. Bact.*, 1954, **67**, 301.
- [2] HARRIS (T. N.) et HARRIS (S.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 159.
- [3] KEOGH (E. V.), NORTH (E. A.) et WARBURTON (M. F.). *Nature*, 1947, **160**, 635.
- [4] KIRBY (W. M. M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1951, **78**, 519.
- [5] SIMPSON (J.). *Med. off.*, 1953, **89**, 85.
- [6] PAKULA (R.). *Med. Dosw. i Mikrob.*, 1952, **2**, 197.
- [7] PAKULA (R.) et WALCZAK (W.). *Med. Dosw. i Mikrob.*, 1954, **4**, 136.

RECHERCHES SUR LA VARIABILITÉ DE "*STREPTOMYCES RIMOSUS*".

par D. BORENSTAJN et J. WOLF

Le problème de la production des antibiotiques est lié à l'isolement d'une souche à grand rendement, à partir de colonies sélectionnées à production maximum d'antibiotique. Les colonies à grand rendement apparaissent à la suite d'une variabilité « naturelle » ou d'une variabilité provoquée artificiellement par les rayons ultraviolets, les rayons X ou par le méthyl-bis-bêta-chloroéthylamine (M. B. A.) [1, 2, 3, 4]. Nous ne connaissons aucun travail consacré à cette question. On trouve cependant quelques publications traitant le côté chimique du problème [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Le présent travail expose nos recherches sur la variabilité de *S. rimosus* produisant de l'oxytétracycline (terramycine). Le but de ces recherches a été :

- 1° La sélection d'une souche à grand rendement,
- 2° La mise en évidence d'une corrélation éventuelle entre le rendement de la souche en question d'une part, et sa morphologie et ses propriétés physiologiques d'autre part. L'établissement d'une telle corrélation devait faciliter la sélection des souches à grand rendement et jeter une certaine lumière sur le mécanisme de production des antibiotiques. Le fait, par exemple, que les souches à grand rendement utilisent l'huile d'arachide ou de soya comme source de carbone, alors que les souches à faible rendement utilisent le saccharose, peut servir de base pour les recherches sur le mécanisme de production de cet antibiotique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Le premier pas dans le travail de sélection d'une souche à grand rendement consiste à éliminer les colonies dépourvues de spores.

On dilue une suspension de spores de *Streptomyces rimosus* de façon à obtenir 10 à 15 cellules par millilitre. On étend 1 ml de cette suspension sur gélose-pomme de terre en boîte de Petri. Après quatre à six jours d'incubation, on prélève du milieu nutritif des disques contenant une colonie sporulée au centre.

On place ensuite ces disques dans une autre boîte de Petri contenant un milieu nutritif ensemencé avec un microorganisme dont la croissance est inhibée par l'oxytétracycline (en l'occur-

rence *B. subtilis* ATCC 6633). Cette boîte est ensuite incubée durant douze à dix-huit heures à 37°.

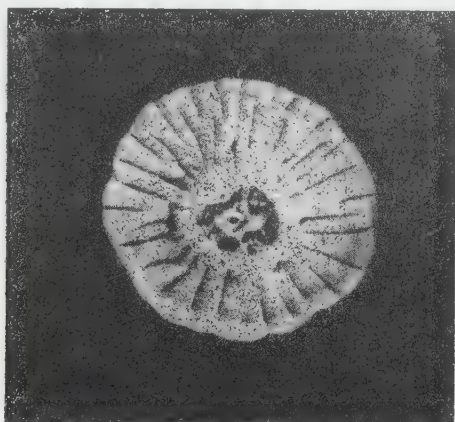


FIG. 1. — Une colonie de *S. rimosus*.

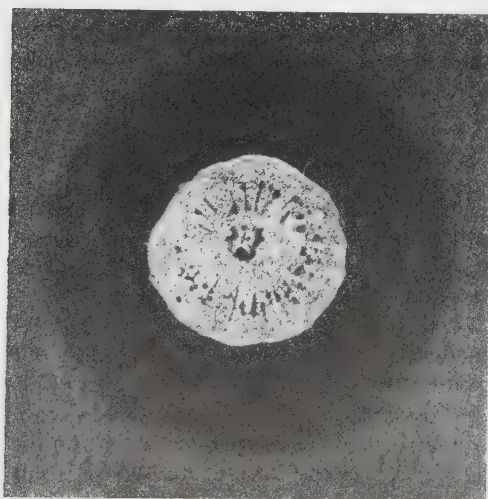


FIG. 2. — Zone d'inhibition de *B. subtilis* 6633 autour d'une colonie de *S. rimosus*.

Le lendemain, on constate la présence d'une zone d'inhibition autour du disque.

Les spores des colonies autour desquelles les zones d'inhibition sont les plus importantes sont ensuite ensemencées sur gélose inclinée. Une certaine quantité de spores prélevées de la même colonie sont ensemencées dans 3 ballons contenant un milieu liquide, soumis à une fermentation en profondeur sur un appareil agitateur pendant quatre à cinq jours.

Ce procédé permet d'établir exactement le rendement en quatre à cinq jours. Nous avons, en effet, noté qu'un rendement d'environ 500 microgrammes d'oxytétracycline par millilitre correspond à une zone d'inhibition de 34 mm de diamètre autour de la colonie.

Cette colonie a servi de point de départ aux travaux ultérieurs sur la variabilité provoquée artificiellement.

La variabilité artificielle était provoquée par les rayons ultraviolets ou par le chlorhydrate de M. B. A.

I. VARIABILITÉ PROVOQUÉE PAR IRRADIATION U.V. — *Mode d'irradiation.* — On prélève les spores d'une culture de *S. rimosus* sur milieu solide.

On prépare ensuite une suspension de 10×10^6 cellules par millilitre de sérum physiologique. On agite la suspension pendant vingt minutes avec des billes de verre, après quoi on dilue jusqu'à 400 000 cellules par millilitre.

On verse dans une boîte de Petri une quantité de cette suspension suffisante pour former une couche de 2 mm d'épaisseur, et la boîte est ensuite placée à 25 cm d'une lampe émettant des rayons ultraviolets d'une longueur d'onde de 2537 Å. Au cours des dix à quinze minutes que dure l'irradiation, la suspension est continuellement mélangée par un agitateur magnétique. Toutes les minutes on prélève 0,5 ml qu'on dilue avec du sérum physiologique jusqu'à 5 ml. Une partie de la suspension non irradiée est diluée jusqu'à 40 cellules par millilitre et sert de contrôle pour établir le pourcentage des cellules tuées.

Finalement, 1 ml des suspensions diluées, irradiées et non irradiées, est ensemencé sur milieu nutritif solide dans des boîtes de Petri qui sont placées à l'éluve quatre à cinq jours.

Résultats de l'irradiation. — Le pourcentage des spores restées vivantes a été dans un cas de 0,7 après dix minutes d'irradiation, une autre fois de 0,1 après douze minutes et dans un troisième cas de 0,05 également après douze minutes d'irradiation.

L'analyse du tableau I montre que le nombre des colonies sporulées diminue au fur et à mesure que le temps d'irradiation augmente.

Il n'a pas été possible d'établir une corrélation nette entre le diamètre de la zone d'inhibition produite par la colonie et son

TABLEAU I. — Résultats de l'irradiation par des rayons ultraviolets d'une suspension de spores de *S. rimosus*.

Souche d'origine isolée à la suite d'une sé- lection	Rende- ment en µg/ml	Temps d'irradia- tion en minu- tes	% de cellu- les res- tées vi- vantes	% de colo- nies sans spores	Nombre de colo- nies res- tées vi- vantes	Rendement d'anti- biotique en µg/ml	Zones d'inhi- bition Ø en mm.			
M ₄	300	1	6	10	100	4-100	da 18 à 30			
		2	7	15						
		3	4	20						
		4	4	17						
		5	3	20						
		6	2	23						
		7	0,8	24						
		8	0,5	25						
		9	0,1	15						
		10	0,1	18						
		11	0,1	29						
		12	0,1	30						
44	500	1	10	15	270	5 100	20-28			
		2	10	15		4 100-200	20-27			
		3	50	7		7 200-250	23-27			
		4	21	20		1 470	28			
		5	1,5	25		5 500	30-25			
		6	1,5	15		1 770	34			
		7	1,2	30		1 1500	37			
		8	0,9	35		3 100-200	20-24			
		9	1	40		1 350	23			
		10	0,7	50		1 450	26			
		118	280	1		8	15			
				2		4	12			
3	3			18						
4	0,9			20						
5	1,5			15						
6	1,6			25						
7	1,0			25						
8	0,8			22						
9	0,3			28						
10	0,1			30						
11	0,4			30						
12	0,05			30						

Dans la colonne « rendement d'antibiotique » le premier chiffre indique le nombre de souches et le second le rendement.

rendement antibiotique au cours de la fermentation en profondeur.

Après l'irradiation nous avons pu isoler des colonies dont le rendement était soit supérieur, soit inférieur à celui de la souche d'origine.

On obtient quelquefois des colonies différentes de la souche d'origine par leur morphologie et par la production de pigments.

Après l'irradiation nous avons choisi, parmi les colonies isolées, celles qui présentaient la meilleure sporulation et autour desquelles les zones d'inhibition paraissaient les plus importantes. Après la première fermentation 5 nouvelles souches furent isolées, qui furent soumises à une seconde fermentation. La meilleure souche était alors utilisée pour une nouvelle sélection, pour

obtenir une souche encore meilleure par la voie de variabilité provoquée.

II. VARIABILITÉ PROVOQUÉE PAR LE M. B. A. — Le procédé est analogue à celui de l'irradiation, la différence consistant à faire séjourner des spores pendant dix à quarante minutes dans un milieu contenant 1,2 p. M de M. B. A. Nous avons isolé environ 1 000 colonies qui ont permis d'obtenir 300 souches. La souche d'origine avait un rendement de 15 à 200 $\mu\text{g/ml}$.

La sélection nous a permis d'obtenir les souches 44, 118 et

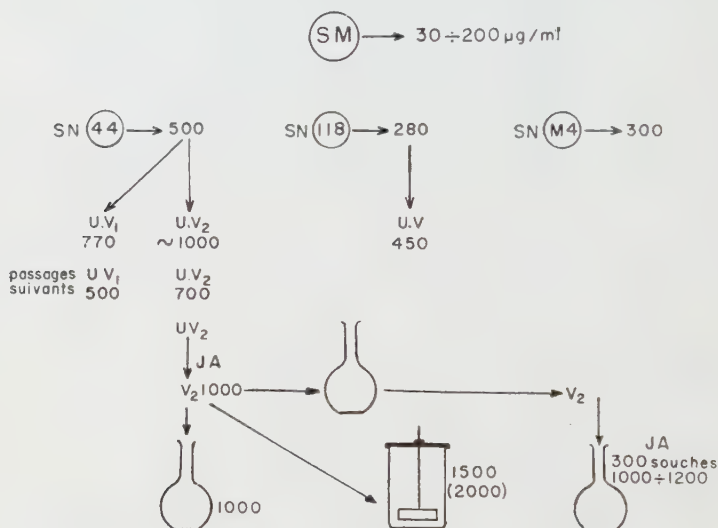


FIG. 3. — Généalogie de la souche V2.

M4, dont le rendement est de 500, 280 et 300 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Après irradiation de la souche 44, nous avons obtenu une souche UV2 d'un rendement de 1 000 $\mu\text{g/ml}$.

Au cours des passages ultérieurs, le rendement de cette souche s'est stabilisé à 700 $\mu\text{g/ml}$. Cette même souche UV2, après l'action de M. B. A., avait un rendement de 1 000 $\mu\text{g/ml}$, au cours des fermentations dans l'appareil agitateur. Dans les récipients industriels (30 à 150 l de volume), elle avait un rendement moyen de 1 500 $\mu\text{g/ml}$ et un rendement maximum de 2 000 $\mu\text{g/ml}$.

La souche UV2 a été de nouveau soumise à l'action mutagène de M. B. A., ce qui a permis d'obtenir 300 souches. Une dizaine

d'entre elles avaient un rendement égal ou supérieur à la souche UV2.

Nous avons isolé en tout 1500 colonies et analysé environ 500 fermentations en profondeur.

Les souches ainsi obtenues gardaient leur rendement supérieur après 5 à 6 passages durant une année au moins.

III. TENTATIVES D'ÉTABLISSEMENT D'UNE CORRÉLATION ENTRE LE RENDEMENT ET LA MORPHOLOGIE OU LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DE LA SOUCHE EN QUESTION. — 1° *Corrélation zone d'inhibition-rendement*. — Nous avons tenté sans succès d'établir une corrélation entre les dimensions de la zone d'inhibition et le rendement. L'existence éventuelle d'une telle corrélation a été étudiée très minutieusement en 1953, au cours de recherches sur la variabilité de *Streptomyces griseus*. Nous avons alors constaté que les colo-

TABLEAU II. — Tentatives d'établissement d'une corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et le rendement des colonies isolées.

No. de la colonie	diamètre de la colonie en mm.	diamètre de la zone d'inhibition en mm.	rendement en µg/ml
28	6	21	300
29	4.5	24	220
30	7	23	180
31	8	22	250
32	10	25	190
33	9	24	180
34	6.5	22	220
35	5.5	21	200
36	9	23	120
37	6	22	230
38	7	25	190
39	6	21	200
40	6	23	150
41	7	24	140
42	8	19	155
43	5.5	23	200
44	10	34	500
45	11	27	200
46	10	24	170
47	9	24	165

nies à grande zone d'inhibition n'étaient pas toujours les meilleures productrices d'antibiotiques.

Nos recherches actuelles ont confirmé ces constatations. Elles sont résumées dans le tableau II.

2° *Corrélation morphologie-rendement.* — Au cours de ces travaux nous avons recherché une corrélation éventuelle entre la morphologie et l'intensité de croissance sur milieux solides d'une part, et le rendement antibiotique d'autre part.

À la suite d'irradiation par les rayons ultraviolets, nous avons vu apparaître des colonies de couleur verdâtre, sécrétant des pigments roses et violets. Ces colonies avaient un rendement inférieur à celui de la souche d'origine qui possédait un mycélium aérien blanc grisâtre et un mycélium de base brun. Ces dernières propriétés caractérisent malheureusement aussi bien les souches à grand qu'à faible rendement. Dans aucun cas nous n'avons réussi à constater de corrélation entre le rendement et la forme ou les dimensions des colonies.

3° *Corrélation propriétés biologiques-rendement.* — Les pro-

TABLEAU III. — Culture de *S. rimosus* sur un milieu liquide avec addition de glucides.

Glucide	Production d'acide	Production de gaz	Couleur	Croissance
Dextrose	++	-	claire amarante	abondante au fond
Lactose	-	-	sans changement	abondante au fond
Maltose	-	-	sans changement	abondante
Sorbitol	++	-	claire rose	en toute profondeur
Manitol	++	-	claire rose	en toute profondeur
Saccharose	-	-	sans changement	faible

On a observé, en outre, la réduction des nitrates en nitrites.

propriétés biologiques présentées dans le tableau III étaient communes aux souches à grand et à faible rendement.

La seule différence (très importante celle-là) consiste en l'utili-

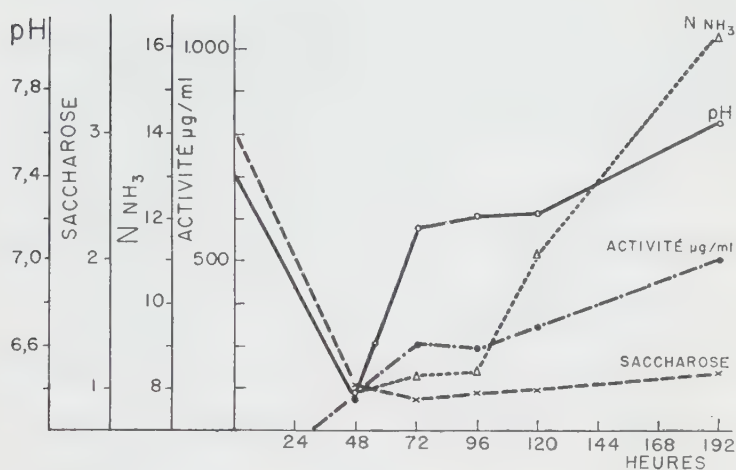


FIG. 4. — Une fermentation au cours de laquelle le saccharose est assimilé.

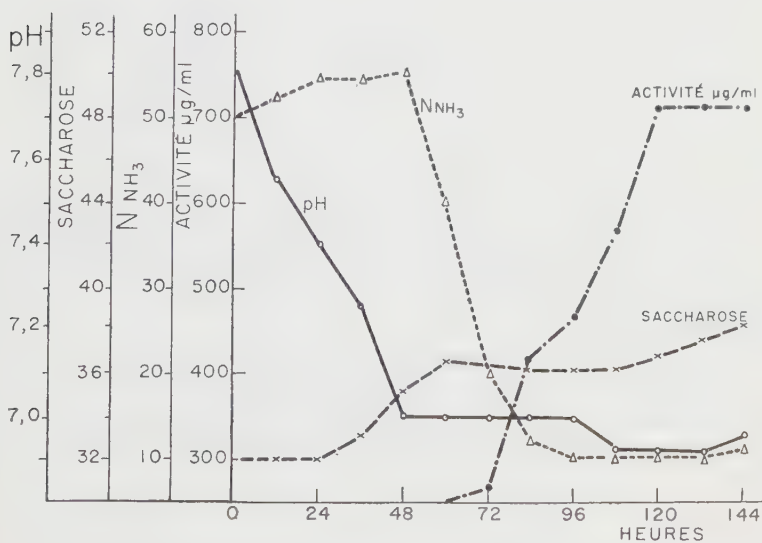


FIG. 5. — Une fermentation au cours de laquelle le saccharose n'est pas assimilé.
Le milieu contient de l'huile d'arachide.

sation, par les souches à fort rendement, d'huile d'arachide ou de soya comme source de carbone, alors que les souches à faible rendement utilisent le saccharose (fig. 4, 5 et 6).

L'addition d'huile restait sans influence sur le rendement des souches faibles, alors qu'elle augmentait de 50 p. 100 environ la quantité d'antibiotique produite par les meilleures souches.

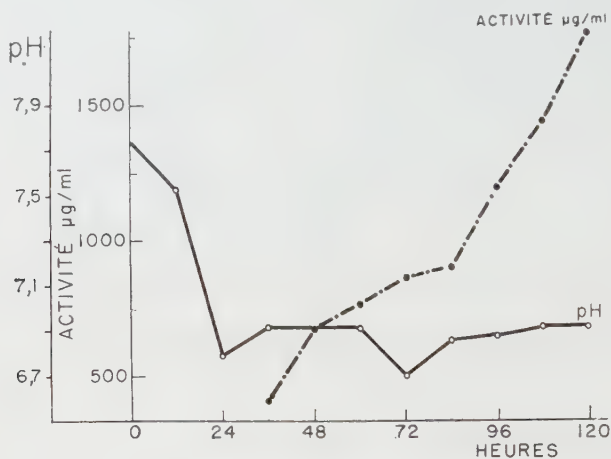


FIG. 6. — Une fermentation à l'échelle semi-industrielle.

CONCLUSIONS.

Par la sélection de colonies à grand rendement, présentes dans une population microbienne mixte (en raison de la variabilité « naturelle » ou de l'activité d'agents mutagènes), nous avons obtenu des souches d'un rendement bien supérieur à celui de la souche d'origine.

Nous n'avons pu établir aucune corrélation nette entre la morphologie de ces colonies et leur rendement.

L'utilisation d'huile d'arachide ou de soya comme source de carbone semble être une propriété des souches à grand rendement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLASE (E. W.). U. S. Patent 2658078.
- [2] CARVAJAL (F.). *Mycologia*, 1953, **2**, 209.
- [3] FINLAY (A. C.), HOBBY (G. L.), PAN (S. Y.), REGNA (P. P.), ROUTTEN (J. B.), SEELEY (D. B.), SHULI (G. B.), SOBIN (B. A.), SOLOMONS (I. A.), VINSON (J. W.) et KANE (J. H.). *Science*, 1950, **111**, 85.

- [4] KURYLOWICZ (W.), WOZNICKA (W.), KORZYBSKI (T.), KOWSZYK (Z.), BORENSZTAJN (D.) et NIEDZWIECKA-TRZASKOWSKA (I.). *Metoda otrzymywania streptomycyny (Une méthode de production de streptomycine)*, PZWL Warszawa, 1954.
- [5] KURYLOWICZ (W.), KORZYBSKI (T.), NIEDZWIECKA-TRZASKOWSKA (I.), KOWSZYK (Z.), BORENSZTAJN (D.) et WOZNICKA (W.). *Metoda otrzymywania aureomycyny (Une méthode de production de l'aureomycine)*, PZWL Warszawa, 1954.
- [6] PERLMAN (D.), TEMPEL (A. E. Jr.) et BROWN (W. E.). *Fermentation Ind. Eng. Chem.*, 1953, **45**, 1944.
- [7] REGNA (P. P.), CARBONI (R. A.) et TIMRECK (A. A.). U. S. Patent 2649488, 18, VIII, 1953.
- [8] REGNA (P. P.) et SOLOMONS (I. A.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 229.
- [9] REGNA (P. P.), SOLOMONS (I. A.), KOTARO MURAI, TIMRECK (A. E.), BRUNINGS (K. J.) et LAZIER (W. A.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4211.
- [10] REGNA (P. P.) et SOLOMONS (I. A.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **53**, 226.
- [11] SOBIN (B. A.), FINLAY (A. C.) et KANE (J. H.). U. S. Patent 2516080, 18, VII, 1950.

RECHERCHES CONCERNANT *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

par I. NIEDZWIECKA-TRZASKOWSKA et M. SZTENCEL.

(Service des Antibiotiques
de l'Institut National d'Hygiène, Varsovie)

Les souches de *Streptomyces aureofaciens* d'origine variée que nous possédons ont montré une perte relativement rapide de la faculté de production de quantités convenables de chlortétracycline. Nous avons donc été obligés de trouver des méthodes assurant un rendement antibiotique stable et se maintenant à un niveau élevé. La découverte de méthodes adéquates représente un problème très important, parce que la lyophilisation n'assure ni la conservation ni le maintien à un degré suffisant des propriétés antibiotiques des souches de *Streptomyces aureofaciens* [1].

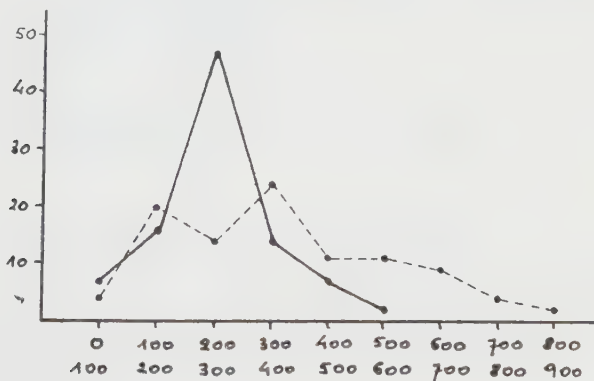
Nos recherches ont porté avant tout sur l'influence éventuelle de la variabilité naturelle et artificielle sur le rendement antibiotique des souches sélectionnées. Nous nous sommes servis pour nos expériences de souches conservées en milieu asparaginé contenant 0,001 p. 100 de FeSO_4 , le milieu ainsi enrichi permettant une augmentation du rendement biologique des souches de *Streptomyces aureofaciens*. Après avoir établi, par des recherches préliminaires, les quantités optimum des composants du milieu utilisé (farine d'arachides, liquide d'extrait de maïs, mélasse et sels minéraux), nous avons déterminé le rendement des souches cultivées en profondeur. Les fermentations eurent lieu dans des appareils agitateurs horizontaux (amplitude 3,5 cm, 120 secousses à la minute) à 26° environ. Pour les cultures, nous avons utilisé des ballons de 750 ml contenant chacun 100 ml de milieu [2].

Des variations furent obtenues artificiellement, surtout au moyen de rayons ultra-violet. Dans un petit nombre d'expériences, nous avons utilisé des rayons X ou de la moutarde azotée, ou bien ces trois facteurs furent appliqués successivement. A l'exception des rayons ultra-violet les autres facteurs n'ont pas donné de résultats favorables et ces recherches ne seront pas décrites dans cette communication.

En comparant le rendement des souches obtenues par sélection des formes variables naturelles et artificielles, avec celui des

TABLEAU I.

Groupes de souches	I passage de fermentation			II passage de fermentation		
	nombre d'expér.	rendement moyen $\mu\text{g/ml}$	rendement maximum $\mu\text{g/ml}$	nombre d'expér.	rendement moyen $\mu\text{g/ml}$	rendement maximum $\mu\text{g/ml}$
Souches d'origine	43	285	650	43	385	780
Souches obtenues par sélection des formes apparues à la suite de variabilité naturelle	18	320	520	18	380	750
Souches obtenues par sélection des formes sporulées apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement	65	340	840	53	360	1150
Souches obtenues par sélection des formes "stériles" apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement	62	485	1185	42	765	1300

FIG. 1. — Rendement des souches d'origine. En abscisses, $\mu\text{g/ml}$; en ordonnées, pourcentage de souches.

— I passage de fermentation.
 - - - - - II passage de fermentation.

souches originelles, on constate qu'on obtient les résultats les plus favorables par la sélection des formes variables artificielles. Sous l'influence des rayons il se produit une forte différenciation

des colonies, se caractérisant surtout par l'intensité de la couleur, témoin de l'activité antibiotique. En plus de l'intensité variable

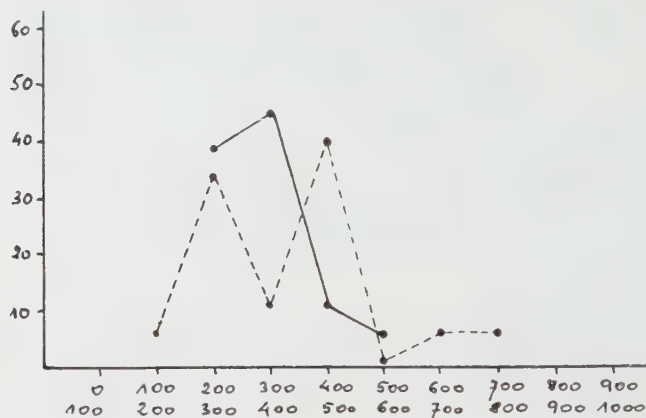


FIG. 2. — Rendement des souches obtenues par sélection des formes apparues à la suite de variabilité naturelle. En abscisses, $\mu\text{g/ml}$; en ordonnées, pourcentage de souches.

— I passage de fermentation.
 - - - - - II passage de fermentation.

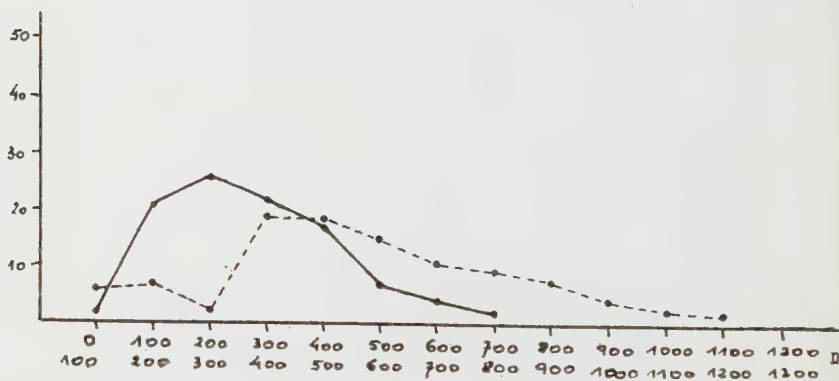


FIG. 3. — Rendement des souches obtenues par sélection des formes sporulées apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement. En abscisses, $\mu\text{g/ml}$; en ordonnées, pourcentage de souches.

— I passage de fermentation.
 - - - - - II passage de fermentation.

de la couleur, on constate une « stérilisation » importante des colonies. Ce sont les souches dérivées des colonies « stériles »

(non sporulées) de couleur orangée qui possèdent la plus grande activité (tableau I).

En groupant les souches selon leur rendement (0 à 100, 100 à 200 $\mu\text{g/ml}$, etc.) on constate que le rendement dépend du genre de variabilité. Dans chaque groupe, un certain pourcentage de souches montre un rendement analogue (voir les fig. 1, 2, 3 et 4).

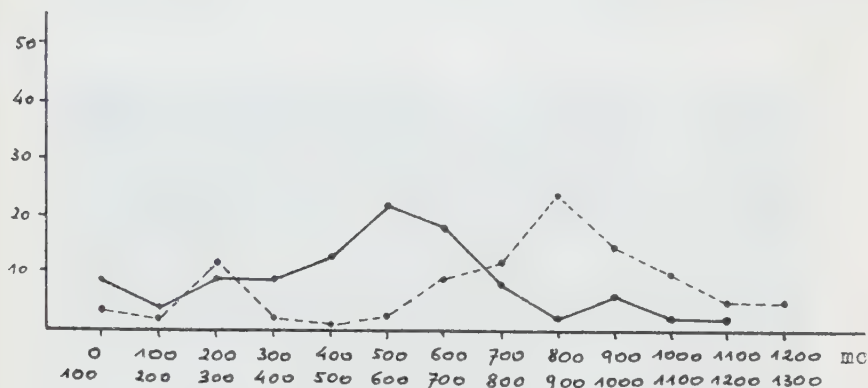


FIG. 4. — Rendement des souches obtenues par sélection des formes « stériles » apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement. En abscisses, $\mu\text{g/ml}$; en ordonnées, pourcentage de souches.

— I passage de fermentation.

- - - - - II passage de fermentation.

Il y a des différences très caractéristiques entre les groupes quant à leur rendement. Le tableau II montre que la plupart des

TABEAU II.

Groupe de souches	Rendement de la plupart des souches dans les différents groupes
Souches d'origine	200 - 400 $\mu\text{g/ml}$
Souches obtenues par sélection des formes apparues à la suite de variabilité naturelle	300 - 500 $\mu\text{g/ml}$
Souches obtenues par sélection des formes sporulées apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement	200 - 500 $\mu\text{g/ml}$
Souches obtenues par sélection des formes "stériles" apparues à la suite de variabilité provoquée artificiellement	600 - 900 $\mu\text{g/ml}$

souches originelles et de celles dues à la variabilité naturelle ou artificielle ont un rendement semblable : de 200 à 500 $\mu\text{g/ml}$. Cependant les souches dérivées des colonies « stériles » obtenues artificiellement ont un rendement de 600 à 900 $\mu\text{g/ml}$, donc bien supérieur.

Etant donné que tous les essais de conservation et de stabilisation d'un rendement élevé des souches sont restés négatifs jusqu'à présent, nous pratiquons la sélection continue de souches

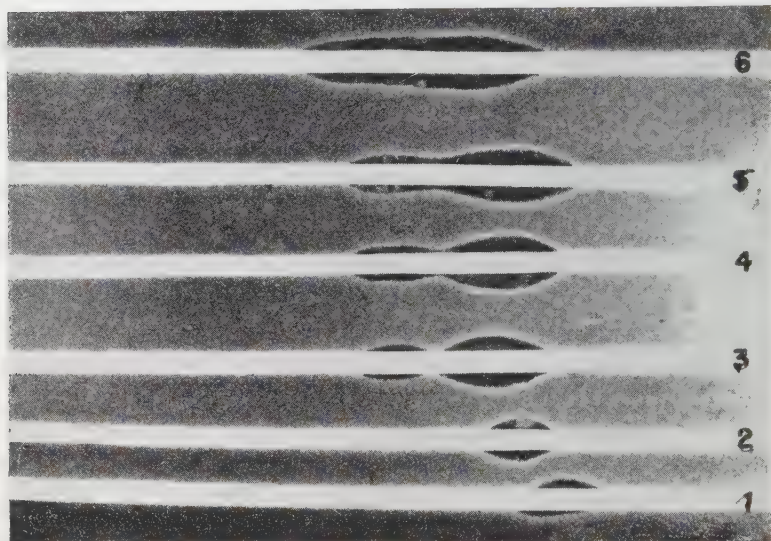


FIG. 5. — Influence de la concentration des liquides d'extrait de maïs en milieu sur l'homogénéité des antibiotiques produits par *Streptomyces aureofaciens*.

Bande n° 1, 0 p. 100 de liquide d'extrait de maïs ; bande n° 2, 0, 1 p. 100 de liquide d'extrait de maïs ; bande n° 3, 0,2 p. 100 de liquide d'extrait de maïs ; bande n° 4, 0,3 p. 100 de liquide d'extrait de maïs ; bande n° 5, 0,4 p. 100 de liquide d'extrait de maïs ; bande n° 6, 0,5 p. 100 de liquide d'extrait de maïs.

dérivées de colonies « stériles » obtenues par variabilité artificielle. Nous choisissons, pour les soumettre à la variabilité artificielle, des souches ayant déjà un rendement important et obtenons ainsi des cultures produisant une quantité considérable d'antibiotique. Cette méthode de sélection continue nous assure un nombre suffisant de souches à rendement élevé.

Nous avons, par des recherches chromatographiques préliminaires, recherché l'influence des composants particuliers du milieu sur la production des diverses substances antibiotiques [3].

Ces recherches ont été effectuées en utilisant la méthode de chromatographie descendante sur buvard Whatman n° 4 avec le système *n*-butanol saturé d'eau + 2,5 p. 100 d'acide acétique glacial. Nous nous sommes servis pour ces expériences le plus souvent de la souche *B. cereus*, moins souvent de spores de *B. subtilis* 6633.

Les recherches, menées actuellement sur l'influence de l'extrait

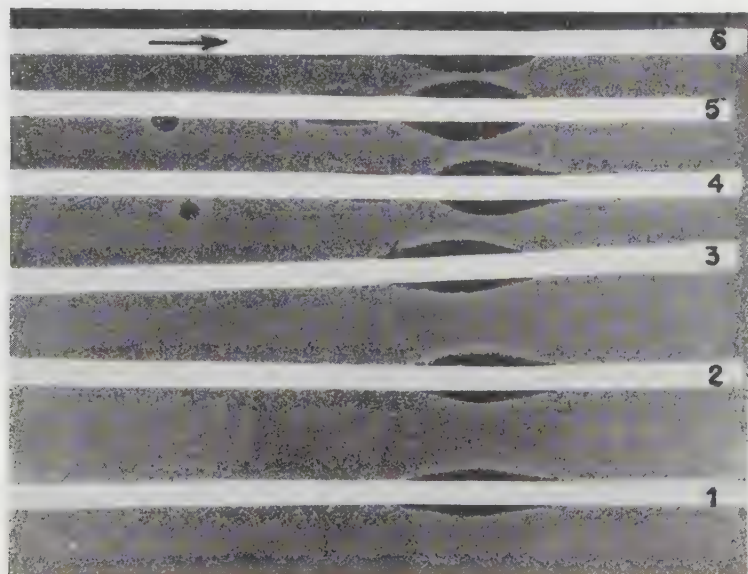


FIG. 6. — Influence de la concentration de la mélasse dans le milieu sur l'homogénéité des antibiotiques produits par *Streptomyces aureofaciens*.

Bande n° 1, 0,1 p. 100 de mélasse ; bande n° 2, 0,2 p. 100 de mélasse ; bande n° 3, 0,3 p. 100 de mélasse ; bande n° 4, 0,4 p. 100 de mélasse ; bande n° 5, 0,5 p. 100 de mélasse ; bande n° 6, 0,6 p. 100 de mélasse.

liquide de maïs ont montré que l'augmentation de la concentration de ce facteur fait apparaître deux zones d'inhibition sur le chromatogramme. L'apparition de la seconde substance inhibitrice se manifeste à la concentration de 0,2 p. 100 d'extrait liquide de maïs, donc au-dessous de la concentration du milieu arachidé habituel de fermentation. Des résultats analogues furent obtenus en ce qui concerne l'influence de la mélasse de maïs à 0,1 p. 100 en en diminuant la quantité. En introduisant différentes concentrations de mélasse dans le milieu (fig. 5, 6 et 7), nous avons constaté que son influence sur l'apparition de la 2^e substance

inhibitrice est faible. Cette substance, en effet, apparaît seulement quand la concentration de mélasse est de 0,4 p. 100, donc deux fois plus forte que dans le milieu arachidé. Le Rf de la substance provoquant l'apparition de la zone d'inhibition la plus éloignée est de 0,62-0,66, celui de la substance responsable de l'apparition de la zone plus proche de l'endroit où a été déposée la goutte est de 0,48-0,50. Le Rf standard de la chlortétracycline dans nos expériences est de 0,67, celui de l'oxytétracycline et de la tétracycline 0,43. La comparaison de ces valeurs indique que la zone d'inhibition plus éloignée est due à la chlortétracycline, alors que la substance provoquant l'autre zone se rapproche des autres tétracyclines, c'est-à-dire de la tétracycline ou de l'oxytétracycline. Ces résultats préliminaires montrent qu'en changeant la composition du milieu, on peut provoquer la naissance de divers

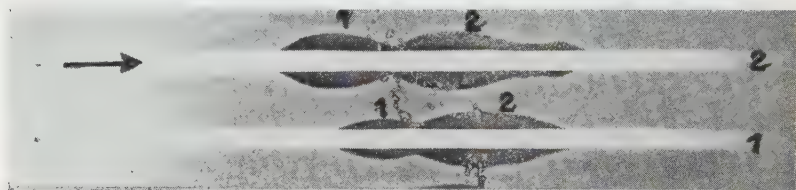


FIG. 7. — Comparaison des chromatogrammes du liquide de fermentation et des standards des tétracyclines.

Bande n° 1, liquide de fermentation ; bande n° 2, standards des tétracyclines (n° 1, corr. à l'oxytétracycline et à la tétracycline ; n° 2, corr. à la chlortétracycline).

antibiotiques du groupe des tétracyclines, en employant la même souche de *S. aureofaciens*.

Nous poursuivons l'étude de l'influence du milieu de fermentation sur l'augmentation du rendement et l'homogénéité de l'antibiotique produit.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VAN DYCK (P.), SOMER (P. DE). *Antib. Chemother.*, 1952, 2, 184.
- [2] KURYLOWICZ (W.), KORZYBSKI (T.), NIEDZWIECKA-TRZASKOWSKA (I.), KOWSYK (Z.), BORENSZTAJN (D.) et WOZNICKA (W.). *Panstw. Zakl. Wyd. Lek. Warszawa.*, 1954.
- [3] ROLLAND (G.) et SENSI (P.). *Il Farmaco (edizione scientifica)*, 1955, 10, 37.

Le Gérant : G. MASSON.

